

Der Einfluß von BK-Kanal-Modulatoren auf die Migration von Gliomzellen

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Peter Krause
geboren am 02.07.1975 in Erfurt**

08.03.2004

Gutachter

1. Prof. Dr. med. S. Patt, Institut für Pathologie, Universität Jena
2. Prof. Dr. med. K. Benndorf, Institut für Physiologie II, Universität Jena
3. Prof. Dr. med. A. Reichenbach, Institut für Neurophysiologie, Universität Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2004

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Azetylcholin
BK Kanäle	Calcium aktivierte Kalium Kanäle mit großer Leitfähigkeit
Ca ₂₊	Calcium
CS ₂₊	Cäsium Ion
CO ₂	Kohlendioxid
CTX	Charybdotoxin
DMEM	Dulbeccos Modified Medium - Zellkulturmedium
DNA	Desoxyribo - Nuclein – Acid
EGF	Epidermal Growth Factor – Epidermaler Wachstumsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum – Zusatz zum Medium der Zellkultur
Hslo	human slow-poke Gen – Gen des BK-Kanals
IBTX	Iberiotoxin
IK Kanäle	Calcium-aktivierte-Kalium-Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit
K ₊	Kalium Ion
kDa	kilo Dalton – Einheit des Molekulargewichtes
K _{IR}	Inwardly Rectifying Kaliumkanäle
LOH	Loss of heterozygosity
µM	mikromolar
mM	millimolar
Na ₊	Natrium Ion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
pS	pico Sievert – Einheit der Leitfähigkeit
RNA	Ribo – Nuclein - Acid
SK	Calcium aktivierte Kalium Kanäle mit geringer Leitfähigkeit
TEA	Tetraethylammonium
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	6
2.	Einleitung	8
2.1.	Klassifikation und Pathologie von primären Hirntumoren	9
2.2.	Gliome	11
2.2.1.	Überblick über die Pathologie und Epidemiologie von Gliomen	11
2.2.2.	Ätiologie und Pathogenese von Gliomen	14
2.2.3.	Infiltrative Eigenschaften von Gliomen	15
2.3.	Ionenkanäle in Gliomen	18
2.3.1.	Kaliumkanäle	19
2.3.1.1.	Struktur und Charakteristika von BK-Kanälen	20
	Struktur und Aufbau	20
	Pharmakologie	23
	Lokalisation und Funktion	23
2.3.1.2.	BK-Kanäle und Zellmigration	24
2.3.1.3.	BK-Kanäle in Gliomen	25
3.	Ziel der Arbeit	27
4.	Material und Methoden	28
4.1.	Zellkultur	28
4.2.	BK-Kanäle in der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1	29
4.3.	Charakterisierung der verwendeten Substanzen	31
4.4.	Zeitraffer Mikroskopie	32
4.5.	Datenanalyse	34
5.	Ergebnisse	36
5.1.	Grundlegende Beobachtungen zur Migration an 1321N1 Gliomzellen	36
5.2.	Einfluss von BK-Kanal inhibierenden Substanzen auf die Migration	39
5.3.	Einfluss von BK-Kanal aktivierenden Substanzen auf die Migration	40

5.4.	Koapplikation von BK-Kanal Aktivatoren und BK-Kanal Inhibitoren.....	43
5.5.	Migration von 1321N1 Zellen bei erhöhtem extrazellulärem Kalium.....	44
5.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Migrationsstudien	45
6.	Diskussion	46
6.1.	Methode der Zeitraffer-Videomikroskopie.....	46
6.2.	Aktivität von BK-Kanälen in 1321N1 humanen Astrozytomzellen.....	47
6.3.	BK-Kanäle in Gliomen	49
6.3.1.	Bedeutung von BK-Kanälen für die Zellmigration	50
6.3.2.	Mögliche Mechanismen der Migrationsbeeinflussung durch BK-Kanäle	54
6.3.3.	Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Migration bei Gliomen.....	56
6.4.	Weiterführende Betrachtungen.....	59
7.	Literatur	61
8.	Anhang	76
	Abbildungsverzeichnis	76
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	78
	Danksagung.....	79

1. Zusammenfassung

In humanen Gliomzelllinien - wie der von uns untersuchten Zelllinie 1321N1 - werden Calcium-abhängige Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit, auch BK-Kanäle oder $K_{ca1.1}$ -Kanäle genannt, in hoher Zahl exprimiert. Die Aktivierung solcher Kanäle wird durch Membrandepolarisierungen getriggert und durch einen Anstieg von intrazellulärem Calcium verstärkt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass dieser Typ eines Kaliumkanals unter physiologischen Bedingungen aktiv bzw. aktivierbar ist. Dennoch ist nach wie vor unklar, welche Rolle dieser Ionenkanaltyp für die Tumorbilogie von Gliomen spielt.

Da Ionenkanäle allgemein an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind, stellte sich die Frage, in wie fern diese auch für die malignitätsbestimmenden Eigenschaften von Tumorzellen (hier Gliomzellen) wie Proliferation oder Migration/ Invasion mitverantwortlich sind.

Da Untersuchungen von anderen Calcium-abhängigen Kaliumkanälen in anderen humanen Zelllinien zu dem Ergebnis führten, dass verschiedene Aktivitätsstadien des Kanals zu einer Beeinflussung der Zellmigration führten, sollte in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Einfluss des Calcium-abhängigen Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit auf die Zellmigration von humanen Gliomzellen untersucht werden.

Zur hochspezifischen Modulation der Aktivität der zu untersuchenden BK-Kanäle fanden in der vorliegenden Studie die als BK-spezifisch bekannten Substanzen Phloretin und NS1619 als Aktivatoren und Iberiotoxin, Paxilline und Tetraethylammonium zur Inhibierung des Kanals Anwendung. Anhand von Zeitrafferexperimenten konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Substanzen, die durch einen direkten Angriff am BK-Kanal zu einer Aktivierung des Kanals führten, in für den BK-Kanal spezifischer Konzentration zu einer fast 50%igen Inhibierung der Migration der beobachteten Gliomzellen führten. Überdies zeigten auch Experimente mit der in der Umgebung von Gliomen in erhöhter Konzentration vorkommenden Substanz Azetylcholin, die indirekt über einen Anstieg des intrazellulären Calciums zu einer Aktivierung des BK-Kanals führt, in etwa gleiche Inhibierungsgrade der Migration. Wir schlussfolgern daraus, dass die Aktivierung von BK-Kanälen zu einer Inhibierung der Migration von Gliomzellen führt, unabhängig

von der Art der Aktivierung. Dieses Ergebnis wurde noch unterstrichen durch die zusätzliche Applikation der BK-Kanal-inhibierenden Substanzen Paxilline und Iberiotoxin zu den durch die BK-Kanal-Aktivatoren Phloretin, NS1619 und Azetylcholin in der Migration inhibierten Gliomzellen. Diese Experimente zeigten eine vollständige Reversibilität der Migrationshemmung und wiesen damit den spezifischen Einfluss der BK-Kanalaktivität auf die Migration der Gliomzellen nach. Wurden die BK-Kanal-inhibierenden Substanzen Paxilline, Iberiotoxin und Tetraethylammonium dagegen allein appliziert, so hatte dies keinerlei Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen.

Weiteren Untersuchungen vorbehalten bleibt die Frage, in wie fern die in vitro nachgewiesene Schlüsselposition des BK-Kaliumkanals für das Migrationsverhalten von Gliomzellen auch in vivo eine Rolle spielt.

2. Einleitung

Gliome sind häufige Hirntumoren, die eine Reihe von Besonderheiten aufweisen. Dazu zählt ihre diffuse Infiltration des umliegenden Hirngewebes. Diese gilt als ein wesentlicher Faktor für die klinische Malignität, da durch die Invasion auch in einiger Entfernung von der makroskopischen Tumor-Hirn-Grenze - im primär als gesund angesehenen Hirngewebe - Tumorzellen gefunden werden können. Diese führen auch nach erfolgter Tumoresektion und adjuvanter Chemo- und Radiotherapie immer wieder zu Rezidiven und sind trotz fehlender Metastasierung für die oft schlechte Prognose von Gliomen von großer Bedeutung.

Eine wichtige Grundvoraussetzung für dieses infiltrative Verhalten ist die Migration (Zellwanderung). Diese wird von vielen Faktoren beeinflusst, so auch von Ionenkanälen, die durch eine bessere technische Charakterisierbarkeit in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt sind. Ihre Expression auf Gliomzellen variiert von der auf normalen Gliazellen. Dies lässt eine funktionelle Bedeutung für das klinisch maligne Verhalten von Gliomen vermuten. Der "Big Conductance" Kalium-Kanal (BK-Kanal) zählt zu jenen Kanälen, deren Expression auf kultivierten Gliomzellen häufig beschrieben wird. Dennoch ist seine funktionelle Rolle bisher weitgehend ungeklärt. Eine Bedeutung dieses Kanals für die Biologie von Gliomen ist allerdings sehr wahrscheinlich, da er extrazelluläre Faktoren und die Signalkaskade in der Zelle verbindet sowie mit Zytoskelettveränderungen assoziiert ist. Dies lässt eine Rolle dieses Kanaltyps für die Migration von Gliomzellen vermuten. Der Fragestellung, ob und in wie fern BK-Kanäle maßgeblich an der Migration von Gliomen beteiligt sind, wird in der vorliegenden Arbeit anhand von Zeitraster-Experimenten an der humanen Astrozytom-Zelllinie 1321N1 untersucht.

2.1. Klassifikation und Pathologie von primären Hirntumoren

Primäre Hirntumoren, die mit 75 % den Großteil aller Tumormanifestationen im ZNS ausmachen und hier näher betrachtet werden sollen, leiten sich aus Neuroepithel und damit assoziierten Geweben meso- oder ektodermalen Ursprungs ab. Die anderen 25% der zentralen Tumoren bilden **Metastasen** vorwiegend von Karzinomen und Melanomen (Merzak et al., 1997). Während die primären Hirntumoren im Körper des Erwachsenen nur etwa 1-2% aller Tumormanifestationen ausmachen, sind sie bei Kindern mit ca. 25% deutlich höher und stehen an zweiter Stelle nach den Leukämien (Pilkington, 1997).

Die klinisch-histopathologische Klassifikation ermöglicht einen differenzierten Zugang zu den einzelnen Subtypen von primären Hirntumoren. Primäre Hirntumoren leiten sich von einer Vielzahl verschiedener Ursprungszellen ab, welche im Laufe des Tumorgeschehens tumorspezifisch sowohl phänotypisch als auch genotypisch modifiziert werden. Es wurde anhand morphologischer Kriterien eine Einteilung der primären Hirntumoren vorgenommen, welche durch Einbinden von Daten zum klinischen Verlauf eine Dignitätsbeurteilung mit einschloß. Dazu wurde durch die WHO ein Graduierungssystem geschaffen, welches anhand histopathologischer Merkmale wie Zelldichte, Kern- und Zellpolymorphie, Mitosen, Nekrosen, Endothelproliferation und der Überlebenszeit die biologische Wertigkeit von Hirntumoren insgesamt und von primären Hirntumoren speziell in Grad I bis Grad IV unterteilt. Grad I entspricht dabei einem hochdifferenzierten, langsam wachsenden Tumor mit guter Prognose und Grad IV einem äußerst aggressiven, schnell wachsenden Tumor mit ungünstiger Prognose (Kleihues und Cavenee, 2000).

Tab. 1: Dignitätsbeurteilung von primären Hirntumoren

	Zelldichte	Polymorphie	Mitosen	Nekrosen	Endothelprol.
Grad I	1	0	0	0	0
Grad II	2	0-1	0-1	0	0
Grad III	3	3	2-3	1-3	1
Grad IV	4	4	3-4	4	4*

0-fehlend, 1-vereinzelt, 2-mehrere, 3-zahlreiche, 4-viele, *- charakteristische Gefäßglomerula (modifiziert nach Kleihues und Cavenee, 2000)

Somit liegt eine Klassifikation der einzelnen Tumorklassen und deren Subtypen anhand der vermuteten Ursprungszelle, der Lokalisierung im ZNS und der Graduierung des Tumors durch den WHO Grad vor (siehe Tabelle 2). Im hier dargestellten Auszug dieser Klassifikation sind nur die glialen Subtypen dargestellt, da nur diese im Zusammenhang mit der von uns verwendeten Zelllinie stehen.

Tab. 2: Klassifikation von Gliomen in Auszügen aus dem WHO-Schema primärer Hirntumoren

Art	Grad	Vorzugslokalisierung	Charakteristik der Histologie
Astrozytome			
-pilozytisches Astrozytom	I	Grosshirn, Sehnerv, Kleinhirn, Hirnstamm	Bipolare Zellen, Zystenbildung, Rosenthalfasern
-diffuses Astrozytom	II	Frontal- und Temporallappen	astrozytenähnliche Zellen, diffuse Infiltration
-anaplastisches Astrozytom	III	Frontal- und Temporallappen	Mitosen, Zellatypien, Zellpolymorphie
-Glioblastom	IV	Frontallappen, Stammganglien	Zellulärer Polymorphismus (Riesenzellen), Nekrosen, Gefäßglomerula
Oligodendrogliome			
-Oligodendrogliom	II	Frontal- und Temporallappen	Runde homogene Zellkerne, klares Zytoplasma, Verkalkungen
-anaplastisches Oligodendrogliom	III	Frontal- und Temporallappen	Hohe mitotische Aktivität, vaskuläre Proliferation
-Oligoastrozytom	II	Frontal- und Temporallappen	Biphasisches oder vermischtes Auftreten astrozytärer und oligodendroglialer Anteile
-anaplastisches Oligoastrozytom	III	Frontal- und Temporallappen	Vergleiche Grad II, zusätzlich Zeichen der Anaplasie
Ependymom (anaplastisches Ependymom)	II (III)	Ventrikel, Rückenmark	Rosetten um Blutgefäße (perivaskuläre Pseudorosetten), evtl. echte ependymale Rosetten

modifiziert nach Kleihues und Cavenee (2000)

Bedeutsam für Klinik und Prognose eines Patienten sind neben der histologischen Klassifizierung des Tumors seine Lokalisation im Zentralnervensystem und die Infiltration in angrenzende zerebrale Strukturen. Letztere findet in der WHO-Graduierung teilweise Berücksichtigung. Pilozytische Astrozytome zum Beispiel sind in der Regel gut abgegrenzt und daher häufig mikroskopisch in toto exstirpierbar,

was ihre sehr gute Prognose und die Zuordnung zu einem Grad I Astrozytom bedingt (Fernandez et al., 2003).

Dennoch bleibt die Klassifikation nach obigen Gesichtspunkten subjektiven Kriterien unterworfen. Eine Aussage zum biologischen Verhalten des *individuellen* Tumors, dessen Ansprechen auf verschiedene Therapiemodalitäten und letztendlich zur *individuellen* Prognose ist nur eingeschränkt möglich. Deshalb gehen die Tendenzen hin zu Klassifikationssystemen, die zusätzlich anhand molekularbiologischer Merkmale eine genauere Subtypisierung zulassen. Dies ist bereits heute von Relevanz, beispielsweise für die unterschiedliche Chemosensitivität histopathologisch nicht unterscheidbarer Oligodendrogliome (Louis et al., 2001).

2.2. Gliome

Gliome stellen mit mehr als 40 % aller primär zentralnervösen Neoplasien die größte Gruppe unter den Hirntumoren dar (Kleihues et al., 1995). Bei den Gliomen handelt es sich um eine uneinheitliche Gruppe von Tumoren, deren Ursprung von glialen Zellen jedoch allen Subtypen gemeinsam ist. Allerdings ist die tatsächliche Ursprungszelle des Tumors nicht bestimmbar, es könnte eine reife Gliazelle sein, es kommen jedoch genauso gut gliale oder neurale Vorläuferzellen in Betracht (Louis et al., 2001).

2.2.1. Überblick über die Pathologie und Epidemiologie von Gliomen

Wie in Tabelle 2 beschrieben, werden den Gliomen eine Reihe histologisch differenter Subtypen mit verschiedenartiger Dignität zugeordnet (Kleihues et al., 2000): dies sind Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Glioblastome und Ependymome.

Nach einer Studie von Berens et al. (1999) beträgt die Inzidenz von Gliomen in der Normalbevölkerung 6 pro 100000 Personen. Sie zeigt zwei typische Peaks, einen in der Kindheit und einen zweiten in der 4. und 5. Lebensdekade. Eine Ausnahme bilden die Glioblastome, die im 6. und 7. Lebensjahrzehnt gehäuft vorkommen (Kleihues et al., 1995). Die durchschnittliche Überlebensrate 5 Jahre nach Diagnosestellung war 25% (Berens et al., 1999), wobei diese je nach histopathologischem Typ sehr stark variiert (maximal 4-5 % im Falle des

Glioblastoms (McLendon et al., 2003) gegenüber 75 % beim pilozytischen Astrozytom (Fernandez et al., 2003)).

Mit 20% aller Neoplasien neuroepithelialer Gewebe sind die **Astrozytome** die am meisten verbreiteten Gliome (Merzak et al., 1997) und zeigen ein breites Spektrum von langsam wachsenden juvenilen pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) bis hin zum hochmalignen Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV), das mit 60% den zahlenmäßig größten Anteil in diese Gruppe hat (Kleihues und Cavenee, 2000). Die Alters- und Geschlechtsverteilung als auch Lokalisierung, Wachstums- und Differenzierungsverhalten bei den Astrozytomen sind stark vom jeweiligen Tumortyp abhängig.

Das **pilozytische Astrozytom** (WHO Grad I) ist vor allem der Tumor des Kindesalters. Dieser Tumor wächst im Vergleich zu anderen diffus infiltrierenden Astrozytomen sehr langsam und ist relativ scharf begrenzt. Er ist histologisch gut differenziert. Lokalisiert ist das pilozytische Astrozytom vor allem in Mittellinienstrukturen wie dem Nervus opticus, dem Thalamus und dem Hirnstamm. Pilozytische Astrozytome tendieren nicht zu einem destruierenden aggressiven Wachstum, auch eine Transformation in malignere Astrozytomstufen wird nur sehr selten beobachtet (Kleihues et al., 1995).

Davon abgegrenzt wird das **diffuse Astrozytom** (WHO Grad II) vom niedrigmalignen Typ. Dieses manifestiert sich vorwiegend im jungen Erwachsenenalter in den Großhirnhemisphären. Makroskopisch zeigt sich ein schlecht abgrenzbarer, aber relativ homogener Tumor. Im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom ist hier nun mikroskopisch die Tendenz, das umgebende Hirnparenchym diffus zu infiltrieren, bereits erkennbar. Aufgrund des vorherrschenden Zelltyps werden drei Untergruppen differenziert: das fibrilläre Astrozytom, das gemistozytische und das protoplasmatische Astrozytom. Das fibrilläre Astrozytom ist die häufigste Form der niedrigmalignen Astrozytome. Dagegen scheint das gemistozytische Astrozytom prädisponiert für eine anaplastische Progression zu sein (Kleihues et al., 1995). Die mittlere Überlebenszeit liegt bei 6 bis 8 Jahren, wobei eine Tumorprogression hin zum Glioblastom oft den lebenslimitierenden Schritt darstellt.

Das **anaplastische Astrozytom** (WHO Grad III) hingegen zeigt diffus oder lokalisiert Zeichen für eine Anaplasie, wie zunehmende Zelldichte, nukleäre Atypien und Zellpolymorphismus. Im Gegensatz zum niedriggradigen Astrozytom steht die vorhandene starke mitotische Aktivität. Anaplastische Astrozytome können sowohl

durch die Progression von niedriggradigen Astrozytomen (vor allem diffuse Astrozytome) entstehen, als auch primäres Biopsieergebnis ohne Hinweis auf eine vorbestehende, weniger maligne Läsion sein. Das Durchschnittsalter von 41 Jahren bei Diagnosestellung liegt zwischen dem der diffusen Astrozytome mit 34 Jahren und dem der Glioblastome mit 53 Jahren. Männer sind dabei fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Die anaplastischen Astrozytome treten ähnlich den diffusen Astrozytomen hauptsächlich in den supratentoriellen Regionen auf. Die Tumorgrenzen sind aufgrund ihrer ausgeprägten diffusen Infiltration sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch kaum bestimmbar. Histopathologisch stellen sie einen zellreichen Tumor mit deutlichen Kernatypien und zahlreichen Mitosefiguren dar. Charakteristisch für den anaplastischen Tumor ist die Tendenz zu einem schnellen Progress in Richtung eines Glioblastoms, welches dann als sekundäres Glioblastom bezeichnet wird. Dieser Prozess dauert im Mittel 2 Jahre (Kleihues et al., 1995).

Der 15 % aller ZNS Tumoren und 60 % aller Astrozytome häufigste und maligneste Hirntumortyp überhaupt ist das **Glioblastom** (WHO Grad IV). Dieses kann zum einen "de novo" entstehen, wird dann als primäres Glioblastom bezeichnet und bildet die obere Altersgrenze der Glioblastome mit durchschnittlich 55 Jahren. Sekundäre Glioblastome entwickeln sich hingegen durch Tumorprogression aus niedriger malignen Astrozytomtypen und manifestieren sich im Schnitt schon im Alter von 45 Jahren. Der Verlauf ist meist rasch progredient, und die mittlere Überlebenszeit bewegt sich unter 1 Jahr (Kleihues et al., 1995). Primäre Symptome sind typischerweise unspezifische neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Persönlichkeitsveränderungen oder bei besonders schnellen Verläufen die Entwicklung von lebensbedrohlichen intrakraniellen Drucksteigerungen. Graue Tumormasse, punktförmige aber auch größere Einblutungsareale und gelbliche Tumornekrosezonen bestimmen das makroskopisch bunte Schnittbild. Histopathologisch sichtbar ist ein anaplastischer, zellreicher Tumor aus wenig differenzierten, pleomorphen glialen Zellen. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sind die Grenzen der Glioblastome aufgrund ihrer diffusen Ausbreitung (meist entlang vorbestehender Strukturen) nicht deutlich zu ziehen. (Kleihues und Cavenee, 2000; Greenberg, 2001).

Auf Oligodendrogliome, Ependymome und Mischtumoren wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen, da eine Astrozytomzelllinie untersucht wurde.

2.2.2. Ätiologie und Pathogenese von Gliomen

In den letzten Jahren wurden die molekularbiologischen Veränderungen, welche den verschiedenen Stadien der Tumorentstehung und Progression zugrundeliegen, intensiv untersucht. Dabei sind wesentliche, für die Entstehung und Progression von Gliomen verantwortliche genetische Veränderungen identifiziert worden. Ein ätiologischer Zusammenhang zu externen Noxen (z.B. eine Beteiligung viraler Bestandteile) konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Gliome entstehen durch genetische Alteration von neuronalen Vorläuferzellen und Gliazellen (Kleihues et al., 1995; Louis et al., 2001). Für diesen Konversionsvorgang ist eine ganze Kaskade von genetischen Veränderungen nötig, wodurch der normale Zellzyklus modifiziert und die Zelle physiologischen Kontrollmechanismen entzogen wird. Hierbei spielen insbesondere wachstumregulierende Faktoren wie Tumorsuppressorgene und Onkogene eine Rolle. Im folgenden werden die wichtigsten molekularen Veränderungen bei Gliomen näher charakterisiert.

Initial findet sich in Gliomen zu 30-40 %, besonders bei astrozytären Formen, eine Alleldeletion auf dem Chromosom 17p, was zu Defekten im TP53 Tumorsuppressorgen führt (von Deimling et al., 1992). Dem als p53 Protein bekannten Genprodukt wird eine zentrale Rolle bei der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus zugesprochen. So hält es den Zyklus einer Zelle mit fehlerhafter DNA Replikation an und leitet die Apoptose ein. Fehlt dieser Mechanismus durch eine Mutation im TP53 Gen, kommt es zur unkontrollierten Replikation fehlerhafter DNA, die dann weiteren Mutationen ausgesetzt ist (Watanabe et al., 1996; Merzak et al., 1997).

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des Verlustes tumorsupprimierender Mechanismen gibt der Nachweis des Verlustes von Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) für bestimmte Genlokalisationen. Dabei wird in Tumor DNA Proben im Gegensatz zur konstitutionellen DNA aus der Blutprobe oft nur noch ein funktionelles Allel gefunden. In der Nähe dieser verlustigen Allele wird die Existenz von Genen mit tumorsupprimierender Wirkung vermutet. Diese Allelverluste sind bei Hirntumoren die am häufigsten nachweisbaren genetischen Alterationen. So wurde bei Oligodendrogliomen ein Verlust der Heterozygotie auf 19q in über der Hälfte der Fälle nachgewiesen, bei Oligoastrozytomen LOH auf 19q und 1p in fast der Hälfte der Fälle. Bei Ependymomen kommt es häufig zur Monosomie 22 oder anderen Veränderungen am Chromosom 22 (Kleihues und Cavenee, 2000).

Weitere Mutationen, die in Gliomen eine Rolle spielen, betreffen Onkogene. Die herausragende Rolle der Onkogene ist vor allem an die Aktivierung von Protoonkogenen (nichtmutiertes Gen) gebunden. Diese kodieren für viele verschiedene Proteine, die im Zellzyklus eine Rolle spielen, wie Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren, Proteine der intrazellulären Signaltransduktion, DNA-bindende Kernproteine (Merzak et al., 1997). Die aus einer Mutation eines Onkogens resultierende Überexpression und Amplifizierung vor allem von Wachstumsfaktorrezeptoren kommt häufig bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen vor. Besonders die Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität sind an der Tumorentstehung und Progression nachgewiesenermaßen beteiligt. Die am besten untersuchten Rezeptoren sind der EGF (Epidermal Growth Factor) und der PDGF (Platelet Derived Growth Factor) Rezeptor. Deren Überexpression und Überaktivierung führt zu einer starken Proliferationszunahme der mutierten Gliazellen (Feldkamp et al., 1997; Shapiro und Shapiro, 1998). Dadurch erhöht sich die Anzahl der veränderten Zellen und die Wahrscheinlichkeit weiterer Mutationen, was eine Tumorprogression bzw. maligne Transformation zur Folge hat. Bedeutsam ist dies beispielsweise für die Tumorprogression vom anaplastischen Astrozytom zum Glioblastom (Westphal et al., 1994).

2.2.3. Infiltrative Eigenschaften von Gliomen

Die entscheidenden Unterschiede zwischen neoplastischen Gliomzellen und normalen Gliazellen sind das ungebremste Wachstum und die diffuse Ausbreitung der Tumorzellen. Im Gegensatz zu anderen Tumoren metastasieren Gliome äußerst selten. Für ihr klinisch malignes Verhalten ist daher vor allem die diffuse Ausbreitung der Tumorzellen verantwortlich. Während dies das oft entscheidende Problem aller nichtpilozytischen Astrozytome (WHO Grad II-IV) aber auch der Oligodendrogliome darstellt, zeigen nur die WHO Grad I Astrozytome ein relativ umschriebenes, nicht diffuses Wachstum.

Dies führt dazu, daß die Gliome makroskopisch zwar scheinbar vollständig reseziert werden können, nicht jedoch mikroskopisch. Das bedeutet, dass Tumorzellen um die Operationshöhle verbleiben, welche außer bei pilozytischen Astrozytomen in nahezu allen Fällen zu einem Rezidivtumor führen. Dabei können sich diese im angrenzenden Bereich in der Nähe der ursprünglichen Tumorlokalisation befinden und zu einem Lokalrezidiv führen oder auch weit entfernt gefunden werden, so daß keine

örtliche Beziehung zum Primärtumor besteht. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist in einem Großteil der Fälle diese diffuse, mikroskopische Aussaat entlang des Neuropils bereits erfolgt. Dadurch besteht bei Gliomen ab WHO Grad II inklusive kaum die Chance einer radikalen kurativen Resektion (Nazzaro et al., 1990). Dies ist ein Grund für die relativ schlechte Prognose der meisten Gliome, die je nach Proliferationsgeschwindigkeit von den niedriggradigen Astrozytomen bis hin zum infausten Zustand beim Glioblastom zusehends schlechter wird (siehe 2.2. Gliome). Erschwerend hinzu kommt die Tatsache, daß die verbleibenden singulären Tumorzellen oft nicht nur eine erneute Proliferation zeigen, sondern zusätzlich viele dieser Residualtumorzellen zu einer Progression hin zu einem maligneren Tumortyp tendieren (Kleihues et al., 1995). Auch der Grund für zunehmende neurologische Dysfunktionen nach erfolgter Tumorresektion ohne Nachweis für einen Rezidivtumor wird im Vorhandensein dieser diffus verteilten Zellen gesehen (Chicoine et al., 1995b). Somit sind es besonders jene Mechanismen, die diesen Zellen dazu verhelfen, diffus und scheinbar barriereelos das umgebende Gewebe zu infiltrieren, denen das wissenschaftliche Interesse gelten sollte. Im Folgenden werden zunächst einige Begriffe, die mit der Infiltration in Verbindung stehen, erläutert.

An der **Infiltration** von Tumorzellen sind unterschiedliche Vorgänge beteiligt. Unter **Motilität** ("einfache Beweglichkeit") wird prinzipiell die Fähigkeit der Zelle zur ungerichteten Bewegung ohne räumliche Beschränkungen verstanden. In manchen Arbeiten wird als Motilität auch das **Oszillieren** der Zellmembran ohne Zellbewegung definiert. In anderen Arbeiten versteht man unter Motilität zusätzlich zur Membranoszillation die zielgerichtete Bewegung und Volumenverringern der Zelle - wie beispielsweise beim Wandern durch schmale Löcher einer Transwell-Kammer, also strenggenommen die eigentliche **Migration** (Zellwanderung). Die vorliegende Arbeit behandelt Oszillation und Zellmigration getrennt. Beide Begriffe werden separat verwendet. Der Begriff Motilität wird hier nicht benutzt.

Eine **Invasion** findet statt, wenn zusätzlich zur Migration die umliegende extrazelluläre Matrix moduliert wird (Giese et al., 1996). Die Invasion umfaßt mehrere Schritte: die Ablösung von Einzelzellen vom Haupttumor, wahrscheinlich als Folge verminderter Expression von Interzellulären Adhäsionsproteinen, die Adhäsion von Tumorzellen an andere Zellen oder den verschiedensten Komponenten der extrazellulären Matrix, die Umformung der extrazellulären Matrix durch proteolytische

Enzyme aus den Tumorzellen, die Angiogenese und zelluläre Mechanismen zur Generierung von Bewegung und zum Durchtreten durch schmale Interzellularspalten einschließlich Interaktionen von Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren und Komponenten des Zytoskeletts (Giese et al., 1994; Pilkington 1994, 1997; Suigiura et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wird Invasion nicht untersucht.

Bevor eine Gliomzelle in das Stadium der Migration und Invasion eintreten kann, wird sie in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus arretiert. Dies entspricht der „go-or-grow“-Theorie (Berens et al., 1990; Merzak et al., 1994; Koochekpour et al., 1995; Chicoine und Silbergeld, 1997). Da sie folglich nicht proliferiert, können auch proliferationsassoziierte Therapien nicht greifen (Merzak und Pilkington 1997; Soroceanu et al., 1999). Erst nachdem der Zustand der Migration wieder verlassen wird, können sie wieder in den Zellzyklus zurückkehren und proliferieren.

Motilität, Migration und Invasion der Zelle unterliegen zellulären Mechanismen, die für Form- und Volumenveränderungen verantwortlich sind. Sie entstehen durch das zelluläre Zusammenspiel von Zytoskelett (Schwab et al., 1996, 1999), Ionenkanälen (Schwab et al., 1996; Bordey et al., 2000, Rondé et al., 2000), intrazellulären Calciumoszillationen (Rondé et al., 2000), Transmittersubstanzen und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF - Chicoine et al., 1995a+b, 1997; Nolte et al., 1997). Die Entstehung von gerichteter Zellmigration erfolgt als ein differenziertes Geschehen an Zellpolen. Ein Lamellopodium aus sich ausrichtenden polymerisierenden Actinfilamenten bildet die Spitze und damit den richtungsbestimmenden Teil der Zelle, während der Zellkörper durch Gel-Sol Verschiebungen und Kontraktionen des kortikalen Aktomyosins retrahiert wird (Condeelis et al., 1993; Lauffenburger et al., 1996; Mitchinson et al., 1996). Bei den Gel-Sol Verschiebungen und der De- und Polymerisierung von Actinfilamenten ist die Zellvolumenregulation maßgeblich beteiligt. Sie wird durch den Transport von Ionen, organischen Metaboliten und anderen osmotisch wirksamen Teilchen über die Zellmembran gesteuert (Schwab et al., 1999; Soroceanu et al., 1999).

Einen wichtigen Faktor für die Generierung von Motilität, Migration und Invasion auf der Zellebene stellen Ionenkanäle dar. In der vorliegenden Arbeit beschränken wir uns auf Untersuchungen des Zusammenhanges zwischen Ionenkanälen, und Migration. Dazu soll im Folgenden eine kurze Einführung und Charakterisierung der Ionenkanäle in Gliomen und vor allem des speziell untersuchten BK Kaliumkanaltyps gegeben werden.

2.3. Ionenkanäle in Gliomen

Ionenkanäle sind Bestandteile der Zellmembran, die grundsätzlich nach der Art des transportierten Ions in verschiedene Klassen unterteilt werden. Weiterhin unterscheidet man liganden- und spannungsgesteuerte Ionenkanäle. Ihre Funktionen differieren je nach Kanaltyp. So regulieren sie das Ionenmilieu der Zelle und somit auch das Zellvolumen, aber auch die Ionenverteilung im Extrazellularraum. Besonders in erregbaren Zellen sind bestimmte Klassen von Ionenkanälen für die Generation eines Aktionspotentials nötig. Andere Kanäle stabilisieren das Membranruhepotential und sind für die Repolarisation verantwortlich. Darüber hinaus bilden sie einen Baustein vieler Rezeptoren in der Zellmembran und vermitteln somit Prozesse der Signalübertragung von extern in die Zelle (Brenner et al., 2000a+b).

Auch in Gliomzellen wurde mit Einführung der Patch-clamp-Technik und des Calcium-Imaging eine unerwartete Vielzahl von Kanaltypen nachgewiesen, unter ihnen verschiedene Typen von Kaliumkanälen (Brismar et al., 1995; Bordey et al., 1998), welche im Folgenden näher charakterisiert werden.

2.3.1. Kaliumkanäle

Kaliumkanäle stellen die größte Gruppe von Ionenkanälen dar (Hille et al., 1992) und kommen in großer Dichte und Vielfalt vor. Der Einsatz der Molekularbiologie und insbesondere die genetische Kartierung machten in den letzten Jahren eine Differenzierung in verschiedene Subtypen möglich. Dies führte jedoch auch zur Charakterisierung immer neuer Kanaltypen und damit zu einer, ständigem Wechsel unterworfenen Klassifikation und Nomenklatur. Anhand der Kanal-Architektur, der Membrantopologie und homologer Sequenzen der Hauptuntereinheiten (α -Untereinheiten) der K^+ -Kanalproteine werden drei Hauptfamilien unterschieden. Zu den Kanälen mit **2** Transmembrandomänen gehört die Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir}). Kanäle mit **4** (2×2) Transmembrandomänen und 2 Poren sind die "TWIK Kanäle" (Tandem pores in a Weak Inward Rectifying K^+ channel). Die größte Verbreitung finden Kaliumkanäle mit **6** Transmembrandomänen, wie die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle, die KCNQ K^+ -Kanäle, die Typ eag K^+ -Kanäle, und drei Arten Ca^{2+} -abhängiger und zum Teil spannungsabhängiger K^+ -Kanäle (BK, IK, SK) (International Union of Pharmacology, 2002; Homepage Prof. Dr. Heinemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena).

Zu den **Ca²⁺- und zum Teil spannungsabhängigen Kaliumkanälen** zählt eine Gruppe strukturell und funktionell unterschiedlicher Kanäle, deren Gemeinsamkeit es ist, der Aktivierung durch intrazelluläres Calcium zu unterliegen. Die Familie der Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanäle wird nach neuer Nomenklatur aus 5 Familien, K_{Ca}1-K_{Ca}5, gebildet. Zu dieser zählen die bisher bekannten Typen der **SK**-small conductance- (5-20 pS) und **IK**-intermediate conductance- (20-80 pS) (K_{Ca}3.1) Kanäle, die beide nicht spannungsabhängig sind und die **BK**-big conductance- (K_{Ca}1.1) (siehe 2.3.1.1.) Kanäle (International Union of Pharmacology, 2002). Im folgenden wird jedoch weiterhin die alte Nomenklatur gebraucht. Die Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich Leitfähigkeit, Sensitivität bezüglich der Aktivierung durch Calcium und Spannung und hinsichtlich ihrer pharmakologischen Beeinflussungsmöglichkeit (Blatz et al., 1987; Kaczorowski et al., 1996; International Union of Pharmacology, 2002). Alle Subtypen weisen eine sehr hohe Selektivität für Kaliumionen auf. Sie kommen in praktisch allen Zellen des Menschen vor. Oft werden verschiedene Subtypen in ein und derselben Zelle exprimiert (Tseng-Crank et al., 1994). Ihre funktionelle Rolle besteht in der Kopplung des zellulären Ca²⁺ Metabolismus und des Membranpotentials mit dem Fluß von K⁺-Ionen und der Membranerregbarkeit der Zelle, also darin chemische Signale und elektrische Signale ineinander umzuwandeln (Blatz et al., 1987; McManus, 1991). Sie tragen dadurch zur Repolarisation nach Depolarisation bei und regulieren das Ruhemembranpotential und die K⁺-Homöostase (Turnheim et al., 1989). Je nach Zelltyp kommt es zur Beeinflussung von Differenzierungsvorgängen, von Proliferation - nachgewiesen in verschiedenen Immun- und Blutzellen, Spermien als auch im Brustgewebe-, von Sekretionsvorgängen in sekretorisch tätigen Zellen und von Erregbarkeit und Kraftgenerierung glatter Muskulatur (Conley, 1996; Blatz et al., 1987). Sie sind auch in Nervenzellen zu finden, wo ihre Hauptaufgabe in der Beendigung des depolarisierenden Teils des Aktionspotentials im Sinne der schnellen Repolarisation bzw. Hyperpolarisation besteht und sie zur Freisetzung von Neurotransmittern an Axonenenden beitragen (Robitaille und Charlton, 1992; Robitaille et al., 1993).

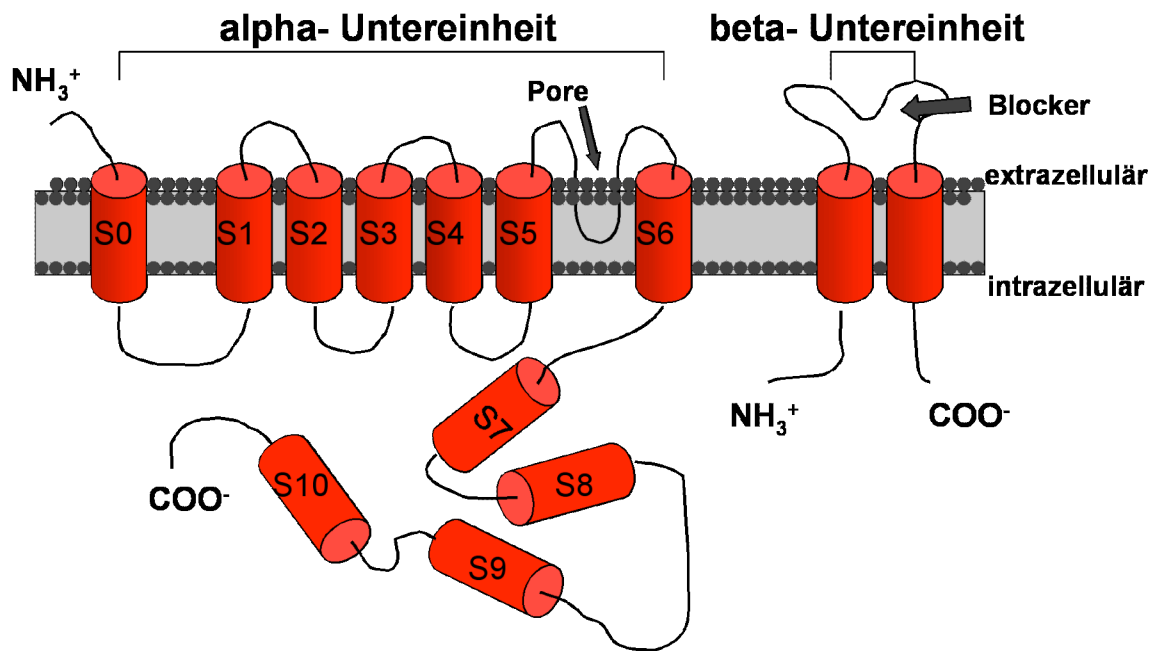
2.3.1.1. Struktur und Charakteristika von BK ($K_{Ca1.1}$)-Kanälen

Struktur und Aufbau

Der erste dieser drei Ca^{2+} abhängigen K^+ -Kanäle, der identifiziert wurde, war der BK Kanal (Blatz et al., 1987). **BK** (big conductance) Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle weisen eine sehr hohe Leitfähigkeit von 100-400 pS auf. Sie können sowohl durch intrazellulären Calcium-Anstieg als auch spannungsabhängig aktiviert werden, wobei eine Zunahme der Depolarisation der Zelle zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle führt (Kraft et al., 2000; 2001). Dabei kommt es zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle. Eine Aktivierung kann auch durch andere externe und interne Stimuli hervorgerufen werden, so durch die die intrazelluläre Calciumkonzentration anhebende Wirkung von Wachstumsfaktoren, durch die Phosphorylierung von BK-Kanal Proteinen, durch einen hohen intrazellulären pH Wert und durch Interaktion mit dem Zytoskelett (Peppelenbosch et al., 1991; McManus et al., 1991, 1996; Benz et al., 1998; Schopf et al., 1999; Ransom et al., 2001). Die Spannungsabhängigkeit der BK-Kanäle steht im Gegensatz zu den anderen bisher entdeckten Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen. Schon eine sehr kleine Dichte solcher BK-Kanäle pro Zelle kann aufgrund seiner hohen Leitfähigkeit zu großen Strömen führen und somit das Membranpotential dominieren. Die zur Aktivierung des Kanals wichtige Calcium-Sensitivität ist je nach Lokalisierung des Kanals sehr unterschiedlich ausgeprägt. Bei Skelettmuskelzellen und Neuronen ist eine höhere Calciumkonzentration nötig (Tseng-Crank et al., 1994) als beispielsweise in glatter Muskulatur (McManus et al., 1995; Valverde et al., 1999). Auch BK-Kanäle mit fehlender Calcium-Sensitivität sind bekannt und in Embryoneuronen beschrieben (Benz et al., 1998). Diese Eigenschaften werden durch den unterschiedlichen Aufbau einzelner BK-Kanal Subtypen verursacht (Latorre et al., 1989; McManus et al., 1991; Ransom et al., 2002; Liu et al., 2002). Molekularbiologisch lässt sich diese Verschiedenheit mittlerweile nachvollziehen, da die Genlokalisierung bekannt ist. Das die alpha-Untereinheit des BK-Kanals codierende *hsl*-Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 10 an Position q22.3. Es handelt sich dabei nur um ein einziges Gen, welches durch unterschiedliches Splicing des RNA-Transkripts verschieden exprimiert wird und dadurch zu den in Bezug auf Aktivierungskinetik, Leitfähigkeit und Calcium-Sensitivität funktionell differierenden BK-Kanaltypen führt (Kaczorowski et al., 1996; Liu et al., 2002). Das

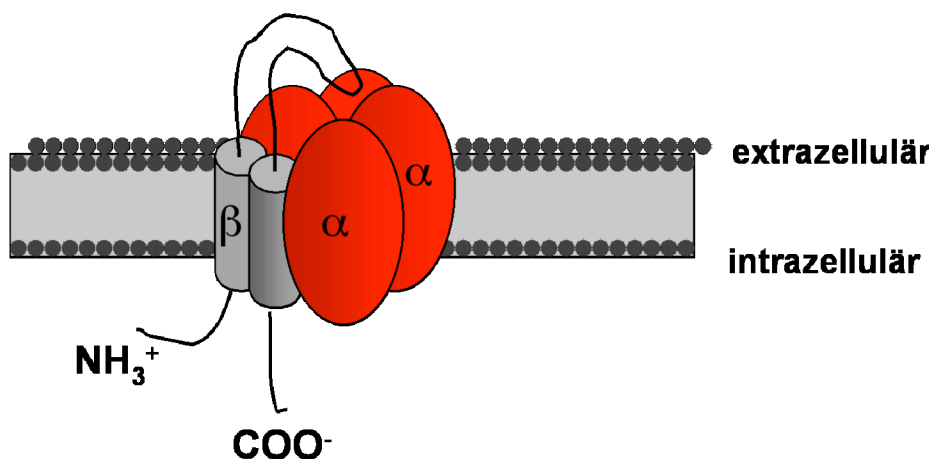
Genprodukt, die alpha-Untereinheit, mit 63 kDa und 7 Transmembrandomänen bildet als Tetramer den funktionsfähigen BK-Kanal und damit die eigentliche Kanalpore. Dies erweitert nochmals die Vielfalt der möglichen Varianten von BK-Kanälen (Kaczorowski et al., 1996; Jeong et al., 2000; International Union of Pharmacology, 2002; Liu et al., 2002). Zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6 jeder alpha-Untereinheit befindet sich die porenbildende Region, S0 und S8 sind für die spannungsabhängige Öffnung verantwortlich, und S9 besitzt zwei Calcium-sensitive Regionen (siehe Abb.3) (Wei et al., 1994; Schreiber et al., 1999). Zusätzlich zur alpha-Untereinheit kann eine akzessorische beta-Untereinheit vorhanden sein. Diese besteht aus 2 transmembranalen Domänen, N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Sie wird je nach Gewebetyp unterschiedlich exprimiert. Es existieren 4 verschiedene beta- Varianten mit unterschiedlichen Genen und Spleißmöglichkeiten. Je nach Typ und Ausprägung ihrer Expression werden Calcium-Sensitivität, Aktivierungskinetik und pharmakologische Beeinflussbarkeit (z.B. Kanalblock durch Iberitotoxin) des Kanals gesteuert (Behrens et al., 2000; Petkov et al., 2001; Ransom et al., 2002). BK-Kanäle in den meisten Neuronen und Skelettmuskelzellen haben keine beta-Untereinheit. Hier ist die Depolarisation und der Calciumanstieg am Aktionspotential zur Öffnung des Kanals nötig (Tsenk-Crank et al., 1996; Jan und Jan, 1997; Valverde et al., 1999). Expression finden verschiedene Subtypen der beta-Untereinheit jedoch in der Gefäßmuskulatur (Brenner et al., 2000a+b; Patterson et al., 2002), in der glatten Muskulatur des Uterus und Ovar (Behrens et al., 2000) und im Gehirn (Weiger et al., 2000). Die verschiedenartigen Funktionen des BK-Kanals sind also auf eine große intrafamiliäre Diversität der BK-Kanäle zurückzuführen.

Abb.3: Struktur der alpha- und beta-Untereinheit des BK-Kanals



Membranbeziehungen und Aufbau eines BK-Kanals sind hier schematisch dargestellt. Es handelt sich dabei um 7 transmembrane Domänen der alpha-Untereinheit und 4 regulatorische Domänen am intrazellulär gelegenen C-Terminus. Zusätzlich kann eine beta-Untereinheit mit zwei Transmembrandomänen koexprimiert sein (siehe Text) (modifiziert nach Kaczorowski et al., 1996; Liu et al., 2002).

Abb.4: Struktur des BK-Kanals bestehend aus 4 alpha-Untereinheiten und einer beta Untereinheit



Dargestellt ist ein BK-Kanal aus vier alpha-Untereinheiten und einer regulierenden beta-Untereinheit (modifiziert nach Homepage Prof. Dr. Brenner und Brenner et al., 2000a+b).

Pharmakologie

Aufgrund der intensiven Bemühungen um eine Klärung der Funktion von BK-Kanälen ist der BK-Kanal nicht nur hinsichtlich biophysikalischer, biochemischer und molekularbiologischer Gesichtspunkte, wie oben angeführt, einer der bestuntersuchtesten Ionenkanäle, sondern auch aus pharmakologischer Sicht. Dies liegt zum Großteil an den vorhandenen hochaffinen Blockern und Aktivatoren dieses Kanals (Kaczorowski et al., 1996).

Zu einer Hemmung der Kanalaktivität führen Substanzen wie Charybdotoxin (CTX), Tetraethylammonium (TEA), Iberiotoxin (IBTX) und Paxilline. Iberiotoxin, erstmalig beschrieben durch Galvez et al. (1990), weist im Gegensatz zu Charybdotoxin eine relativ hohe Selektivität für BK-Kanäle auf (Candia et al., 1993). Auch Paxilline gilt nach einer Arbeit von Gribkoff et al. (1996) als hochpotenter Inhibitor. Inzwischen sind auch eine Reihe BK-Kanal aktivierender Substanzen bekannt. Ein recht selektiver Vertreter ist NS1619, auch wenn für glatte Muskelzellen ein kleiner Teil der Aktivierung der intrazellulärer Freisetzung von Calcium zugeschrieben wird (Yamamura et al., 2001). Ein solcher Einfluß ist bisher für Phloretin, einen weiteren selektiven BK-Kanal Aktivator nicht beschrieben (Gribkoff et al., 1996).

Durch die Verfügbarkeit spezifischer pharmakologischer Modulatoren ist es heute leicht möglich, einen Einblick in die komplexen Funktionen von BK-Kanälen zu gewinnen.

Lokalisation und Funktion

BK-Kanäle kommen in verschiedenen Geweben vor und das sowohl in erregbaren Zellen als auch in nicht erregbarem Gewebe (Latorre et al., 1989; McManus et al., 1991; Ransom et al., 2002). Erregbare Zellen bringen die wichtigsten Voraussetzungen für eine Aktivierung von BK-Kanälen mit sich: starke Depolarisationen und ein Anstieg von intrazellulärem Calcium (aufgrund der Aktivierung von Calcium-Kanälen). So beeinflussen sie in glatter Muskulatur durch Hyperpolarisation den Basaltonus und die Kontraktion (Hurley et al., 1999; Brzezinska et al., 2000; Herrera et al., 2000; Behrens et al., 2000). In Neuronen steuern sie die Repolarisation nach Aktionspotential und die Freisetzung von Neurotransmittern (Golding et al., 1999; Poolos und Johnston, 1999).

BK-Kanäle werden auch in vielen nicht erregbaren Zellen exprimiert, beispielsweise in Lymphozyten, retinalen Müllerzellen und humanen primären Hirntumoren (Meningiome und Gliome) (Brismar and Collins, 1989; DeCoursey et al., 1996; Kraft et al., 2000; Bringmann et al., 2000; Ransom und Sontheimer, 2001). Den BK-Kanälen hier eine spezifische Funktion zuzuschreiben ist schwieriger. Einige Autoren beschreiben eine Abnahme der Proliferation bei Hemmung der BK-Kanäle, so beispielsweise in einer Arbeit von Wiecha et al. (1998) im Falle der Endothelzelle oder auch bei Astrozytomen (Basrai et al., 2002). In anderen Zelltypen wie Meningiomen und Astrozytomen ist dies nicht nachweisbar (Chin et al., 1997; Kraft et al., 2000). Dies spricht für eine differierende Funktion von BK-Kanälen in verschiedenen Zelltypen aber auch dafür, daß die Zelle entsprechend ihren jeweiligen physiologischen Bedürfnissen eine unterschiedliche BK-Kanal Ausstattung aufweist (Ransom et al., 2002). Daß BK-Kanäle durch Ionen- und dadurch auch Volumenverschiebung einen Einfluß auf das Migrationsverhalten von Zellen haben könnten, steht seit längerem zur Diskussion und soll im Folgenden betrachtet werden.

2.3.1.2. BK-Kanäle und Zellmigration

Wie bereits im Kapitel 2.2.3. „Infiltrative Eigenschaften von Gliomen“ beschrieben, sind die wichtigsten, die Zellmigration beeinflussenden Faktoren das Zytoskelett, Rezeptoren der Zellmembran mit ihren Liganden und der Einfluss von Ionenkanälen auf das Zellvolumen und die intrazelluläre Ionenkonzentration. In der migrierenden Zelle interagieren diese Bestandteile in einer komplexen Art und Weise, die noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Wegweisende Arbeiten bezüglich der Bedeutung von Ionenkanälen für die Zellmigration stammen von Schwab et al. (1996, 1999; 2001a). Sie untersuchten intermediate conductance (IK) Calcium-abhängige Kaliumkanäle an Nierenzellen, Melanomzellen und Fibroblasten und wiesen nach, dass bei der Migration ein Zusammenspiel von Ionenkanälen, Zellvolumenveränderungen und Depolymerisation und Polymerisation von Actinfilamenten nötig ist, um eine Bewegung zu generieren. Die polarisierte Zelle depolymerisiert die Aktinfilamente am abgerundeten, retrahierten Zellende, transportiert die Fragmente an die flache Spitze der Zelle und polymerisiert sie dort wieder. Dieser Prozess wird durch Calcium-abhängige Enzyme gesteuert. Somit sind am Zellende für die Depolymerisierung Calciumoszillationen und eine regulierende Volumenabnahme nötig. Letztere wird

nachgewiesenermaßen von den Calcium-abhängigen Kaliumkanälen (Typ IK) hervorgerufen (Schwab et al., 1996, 1999). Schwab et al. zeigten, daß dabei bis zu 20 % des intrazellulären Kaliums die Zelle verläßt. Dieser Kaliumausstrom wird von einem Chlorid- und Bikarbonat-Ausstrom begleitet und führt zum Schrumpfen der Zelle und einem Nachziehen des Zellendes. Andere Kanäle führen dann erneut zum Einstrom von Ionen und damit Flüssigkeit, und der Prozess beginnt von vorn. Dieser komplexe Vorgang ist nur durch asymmetrische Ionenkanalverteilung in der Zelle möglich. Für Kaliumkanäle wurde eine vermehrte funktionelle Ausbildung am Zellende nachgewiesen (Reinhardt et al., 1998). Der Block wie auch die Aktivierung dieser Kaliumkanäle führten zu einer Abnahme der mittleren migrierten Strecke, was dafür spricht, dass nur die dynamische Veränderung des Aktivitätszustandes der Kanäle den komplexen Prozess der Migration fördert (Schwab et al., 1999).

Auch in anderen Arbeiten ist ein direkter Zusammenhang zwischen einer regulatorischen Volumenabnahme und der Aktivität von K-Kanälen beschrieben (Pasantés-Morales et al., 1994, 2000; Ordaz et al., 2004).

Da auch BK-Kanäle durch Calciumoszillationen und Zytoskelettveränderungen aktiviert werden und durch ihre hohe Leitfähigkeit bei Aktivierung zu großen Ionenverschiebungen führen, sind gerade sie mögliche Kandidaten für schnelle Volumenveränderungen bei der Zellmigration.

2.3.1.3. BK-Kanäle in Gliomen

BK-Kanäle wurden in Gliomen erstmalig von Brismar et al. (1989) beschrieben. Ransom und Sontheimer (2000) wiesen zusätzlich eine deutlich stärkere Expression von BK-Kanälen in Gliomen im Vergleich zu normaler Glia nach. Interessanterweise korrelierte auch die Höhe der Expression positiv mit dem jeweiligen Malignitätsgrad der untersuchten Gliomsubtypen (Liu et al., 2002), möglicherweise ein Effekt der Genlokalisierung auf dem Chromosom 10, welches bei vielen Tumoren, so auch bei Gliomen betroffen ist (Tseng-Crank et al., 1994).

Gliomen exprimieren eine eigene Isoform des BK-Kanals, die zugleich die einzige in Gliomen exprimierte Form darstellt (Liu et al., 2002). Diese zeigt eine verlangsamte Kanalaktivierung und eine deutlich gesteigerte Calcium-Sensitivität (Liu et al., 2002; Ransom et al., 2002). Auch in Gliomen besteht die Antwort der Zelle auf Neurotransmitter in einem Anstieg des intrazellulären Calciums (Brismar, 1995; Weydt et al., 1997). Dies kann zu einer Aktivierung von BK-Kanälen führen. Auch

rezeptorinduzierte Calcium-Oszillationen, die in Gliomen beobachtet wurden, scheinen durch die Aktivität von BK-Kanälen unterstützt zu werden (Bordey et al., 2000). Bekannt ist, dass Veränderungen des intrazellulären Calciumgehaltes die Migration von Neuronen modulieren (Komuro et al., 1996). Solche Calcium-Oszillationen, die durch eine Stimulation von muskarinischen Azetylcholinrezeptoren hervorgerufen wurden, sind mit einer Hemmung der Migration von Gliomzellen assoziiert (Bordey et al., 2000). Somit scheint in Gliomen die Aktivierung von BK-Kanälen nicht nur in den Prozess der Signalmodulation von intrazellulärem Calcium involviert zu sein, sondern eine bedeutende Rolle bei der Zellmigration spielen. Bei Bordey et al. (2000) bleibt jedoch unklar, ob es sich dabei um eine durch Anstieg des intrazellulären Calciums vermittelte Aktivierung handelt oder um einen direkten Effekt auf den BK-Kanal. Auch wenn die BK-Kanäle durch den Anstieg von intrazellulärem Calcium aktiviert würden und über diesen Mechanismus die Migration hemmen, wäre dies ein wichtiges Phänomen. Andererseits könnte die direkte Beeinflussung von BK-Kanälen durch spezifische Substanzen die BK-Kanalaktivität unmittelbarer mit der Modulation der Migration in Verbindung bringen (Kraft et al., 2003).

Außer hinsichtlich der Migration gibt es auch Untersuchungen des Zusammenhanges von BK-Kanälen und Proliferation in Gliomen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Blockade der BK-Kanäle unter bestimmten Bedingungen zu einer Hemmung der Proliferation führt (Basrai et al., 2002).

3. Ziel der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Fragestellung, ob und in wie fern ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von BK-Kanälen ($K_{Ca1.1}$) in der Astrozytomzelllinie 1321N1 und dem Migrationsverhalten dieser Zellen besteht. Um diese potentielle Bedeutung von BK-Kanälen für die Tumorbilogie von Gliomen näher zu beleuchten, wurde der Effekt von BK-Kanal spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren auf die Migration der Gliomzellen untersucht. Dazu wählten wir die Methode der mikroskopischen Zeitrafferaufnahme.

4. Material und Methoden

4.1. Zellkultur

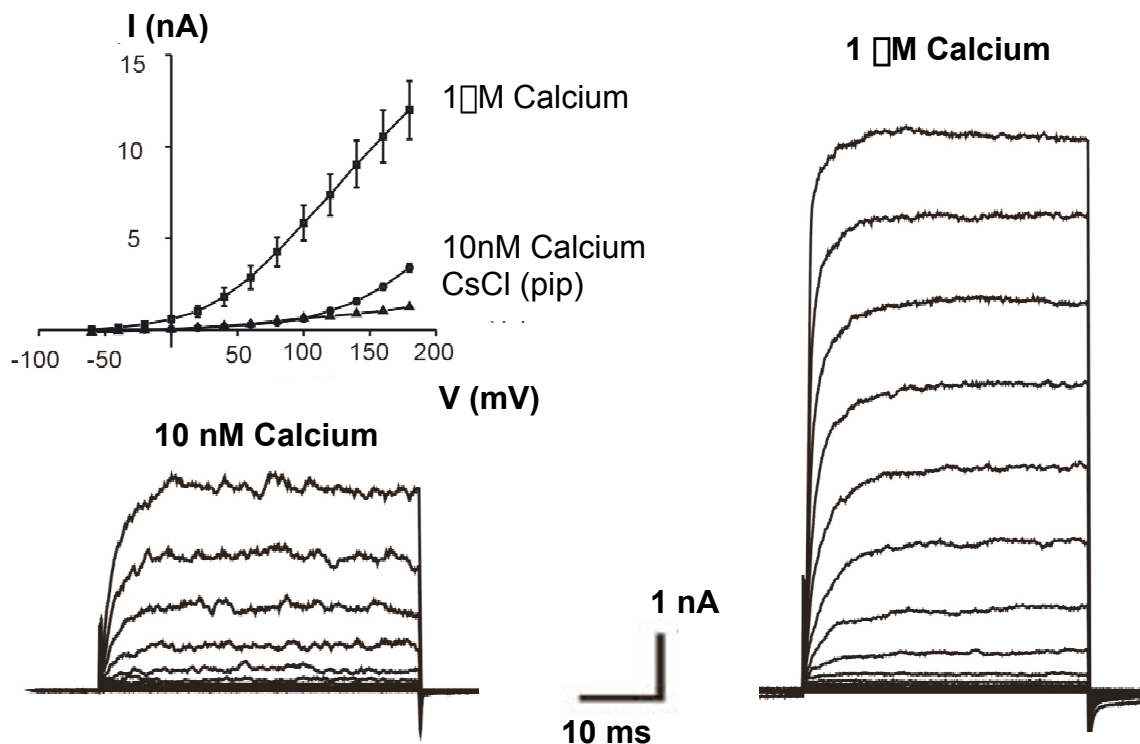
Alle hier dargestellten Experimente wurden mit der Zelllinie 1321N1 durchgeführt. Diese entspricht einem humanen astrozytären Gliom. Die Zellen von 1321N1 zeigen eine gliale Morphologie. Das Gliom exprimiert eine p53 Protein Mutante, ein c-myc Onkogen mit einer t(8; 14) Translokation und zeigt hohe Transkriptionslevel des ersten Exons des c-myc Onkogens (ICI Pharmaceuticals Ltd. UK). Der Bezug der Ursprungszellen erfolgte von der European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK aus dem Labor CAMR (Centre for Applied Microbiology & Research). Neue Chargen wurden aus der Zellkultur des Pathologischen Instituts der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Leiter Dr. Neupert übernommen. Die Zellkultur wurde nach den Empfehlungen des Bezugslaboratoriums durchgeführt. Als Nährmedium diente Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit Earle's Salzen und L-Glutamin (Life Technologies Ltd. Paisley, Scotland UK) zuzüglich 10 % Fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom, Deutschland) und 16 µg/ml Gentamycin. Nach der Resuspendierung in oben erwähntem Medium wurden die Zellen in unbehandelte Kulturflaschen (Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 5 ml DMEM + 10 % FKS + 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Life Technologies, Deutschland) in einem Brutschrank unter Standardbedingungen 5 % CO₂ / 95 % Luft, 37 °C aufbewahrt. Es fand zweimal wöchentlich ein Wechsel des Mediums statt. Nach Erreichen einer Dichte von zirka 400.000 bis 500.000 Zellen / ml Medium, bestimmt durch Auszählung in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer, wurden diese mit 0,25 % Trypsin abgelöst. Nach Resuspendierung in Medium wurde in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:10 umgesetzt, d.h. Zellen mit einer Zelldichte von 50.000 Zellen / ml erneut in Kulturflaschen für zukünftige Passagen eingebracht. Für die Zeitraffer (Time-lapse) -Experimente wurden die Zellen mit einer Dichte von 20.000 / ml auf unbeschichteten Petrischalen (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) ausgesäht. Verwendet wurden in allen Experimenten Zellkulturpassagen zwischen 5 und 25. Die in den unbeschichteten Petrischalen angesetzten Kulturen verblieben jeweils zwischen 36 h und 48 h in standardisierter Atmosphäre. Diese Zeit ermöglichte eine Haftung auf

dem Grund der Petrischale. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen den Zeitraffer-Untersuchungen zugeführt.

4.2. BK-Kanäle in der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1

Bei den durchgeführten Experimenten wurde davon ausgegangen, dass die Zelllinie 1321N1 unter physiologischen Bedingungen BK-Kanal-bedingte Ströme besitzen. Dies zeigten andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe anhand elektrophysiologischer Untersuchungen (Kraft et al., 2001; Basrai et al., 2002).

Abb.5: Elektrophysiologische Eigenschaften von BK-Kanälen in 1321N1 humanen Gliomzellen

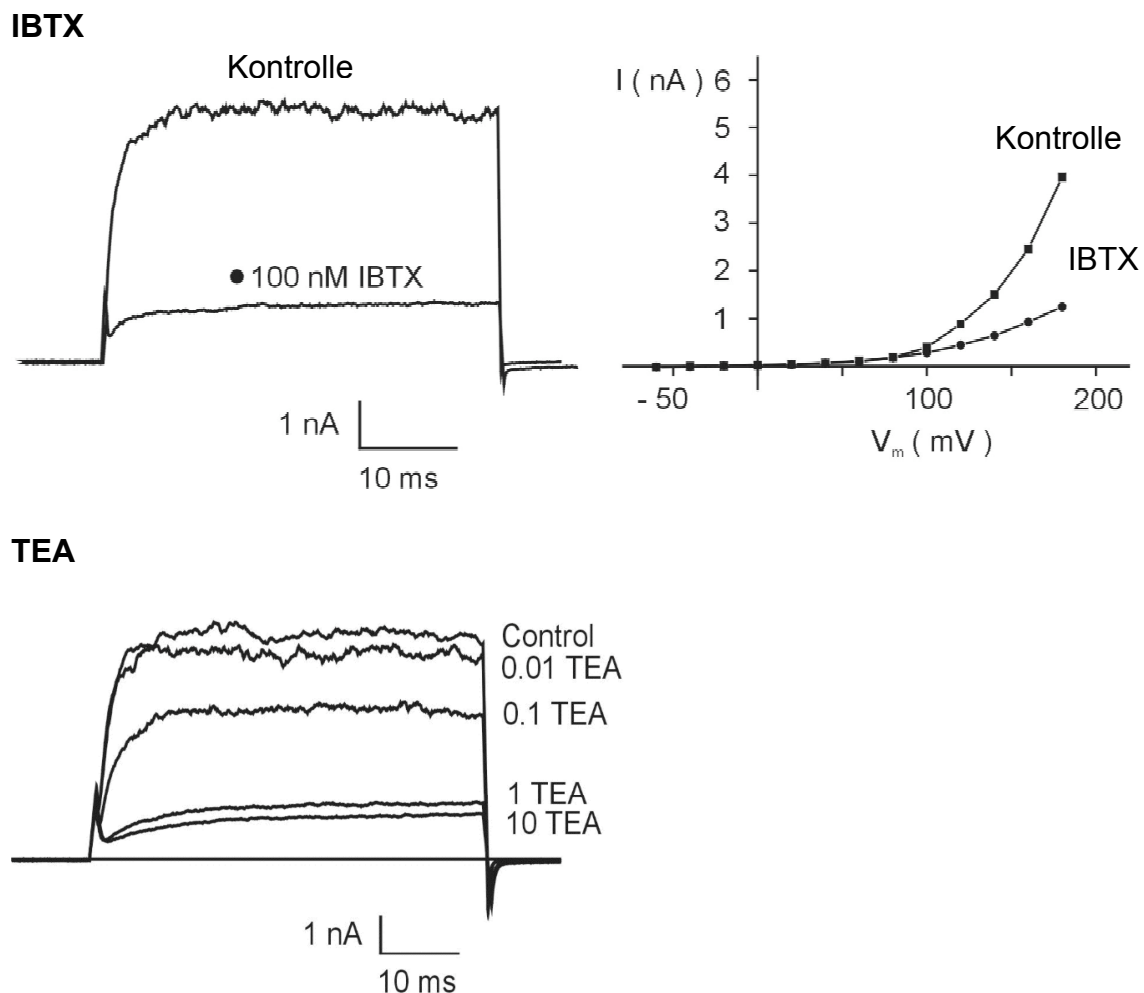


Bei Verwendung K^+ -haltiger Pipettenlösungen führt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 10 nM auf 1 μ M zu einer deutlichen Zunahme der Auswärtsströme. In Gegenwart Cs^+ -haltiger Pipettenlösung sind diese Auswärtsströme unterdrückt. Mit einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 10 nM werden die spannungsabhängigen BK-Kanäle erst bei Membranpotentialen $> +50$ mV aktiviert. Bei 1 μ M intrazellulärem Ca^{2+} zeigt sich eine Aktivierung bereits bei -20 mV, was dem Membranruhepotential in 1321N1-Zellen entspricht (Basrai et al., 2002; Kraft et al., 2001).

In der Spannbreite der physiologisch in Gliomen vorkommenden intrazellulären Calciumkonzentrationen von 10 nM bis 1 μ M (Bordey et al., 2000) waren bei einem vorher nachgewiesenen physiologischen Ruhemembranpotential in den Zellen BK-Ströme nachweisbar. Eine Depolarisation oder/und ein Anstieg des intrazellulären Calciums führten zu einer Steigerung des Stromflusses (siehe Abb.5).

Die für eine Aktivierung des Kanals nötige Spannung betrug bei 1 μ M intrazellulärem Calcium $+42 \pm 1$ mV. Diese Ströme konnten mit den BK-spezifischen Inhibitoren IBTX (100nmol) und TEA (1mmol) gehemmt werden (siehe Abb.6).

Abb.6: Pharmakologische Beeinflussung der BK-Ströme in 1321N1 humanen Gliomzellen



Mit einer Konzentration von 100 nM hemmt der BK-Kanal spezifische Blocker Iberiotoxin (IBTX) den Auswärtsstrom um mindestens 70%. Der Block der Ströme mit Tetraethylammonium (TEA) in einer BK-Kanal spezifischen Konzentration von 1 mM beträgt ebenfalls 70%. Bei höheren TEA-Konzentrationen können weitere Kaliumkanaltypen inhibiert werden (Abbildung modifiziert nach Basrai et al., 2002).

4.3. Charakterisierung der verwendeten Substanzen

Um den Einfluß des Calcium-abhängigen Kaliumkanals vom BK-Typ auf die Migration der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 näher zu untersuchen, kamen in den Experimenten eine Reihe möglichst spezifischer Blocker und Aktivatoren dieses Kanaltyps zur Anwendung.

Diese Substanzen, die alle von der Firma SIGMA (SIGMA-3050 Spruce Street, Saint Louis, Missouri 63103 USA) stammen, wurden jeweils entsprechend ihrer Konzentration in 5 ml DMEM + 10 % FKS gebracht und standen so als Medium für die einzelnen Time-lapse-Untersuchungen zur Verfügung.

Als **Blocker** von verschiedenen Typen von Kaliumkanälen (siehe Einleitung) wurde zunächst die Substanz Tetraethylammonium (**TEA**), FW 167 g/mol verwendet (Basrai et al., 2002). Diese Substanz hat bekannterweise, je nach verwendeter Konzentration, neben der Inhibierung des BK-Kanals einen verschieden starken Einfluss auch auf andere Kanäle, v.a. Kaliumkanäle (Lang et al., 1990). Verwendet man Konzentrationen <1mmol/l, so handelt es sich um einen nur den BK-Kanal betreffenden (Lang et al., 1990). Als weiteren Blocker verwendeten wir Iberiotoxin (**IBTX**), FW 4230 g/mol, ursprünglich als Skorpiongift bekannt geworden, mit einer hohen Spezifität für BK-Kanäle und einer 65 % Inhibierung des BK-Stromes (Gribkoff et al., 1996; Kraft et al., 2001; Basrai et al., 2002) und **Paxilline**, FW 435,6 g/mol, einer von einem Pilzgift abgeleiteten Substanz (*Penicillium paxilli*), Stammlösung in Methanol (10mg/ml) mit einer hohen Spezifität für BK-Kanäle und einer 80 % Inhibierung des BK-Stromes (Knaus et al., 1994; Gribkoff et al., 1996).

Als **Aktivatoren** des BK-Kanals wurden folgende Substanzen verwendet: **Phloretin**, FW 274,3 g/mol, ein pflanzlicher Wirkstoff, Stammlösung in Äthanol (10 mg/ml) (Gribkoff et al., 1996; Ransom et al., 2001) sowie **NS1619**, FW 362,3 g/mol, ein synthetisch hergestellter Aktivator, Stammlösung in Äthanol (26 mg/ml), (Gribkoff et al., 1996; Yamamura et al., 2001). Zur Prüfung der physiologischen Relevanz der Versuche (siehe Teil Ergebnisse) wurde weiterhin die Substanz Azetylcholin (ACh) verwendet (Bordey et al., 2000).

Das verwendete Medium DMEM ist bereits im Abschnitt Zellkultur charakterisiert worden.

4.4. Zeitraffer-Mikroskopie

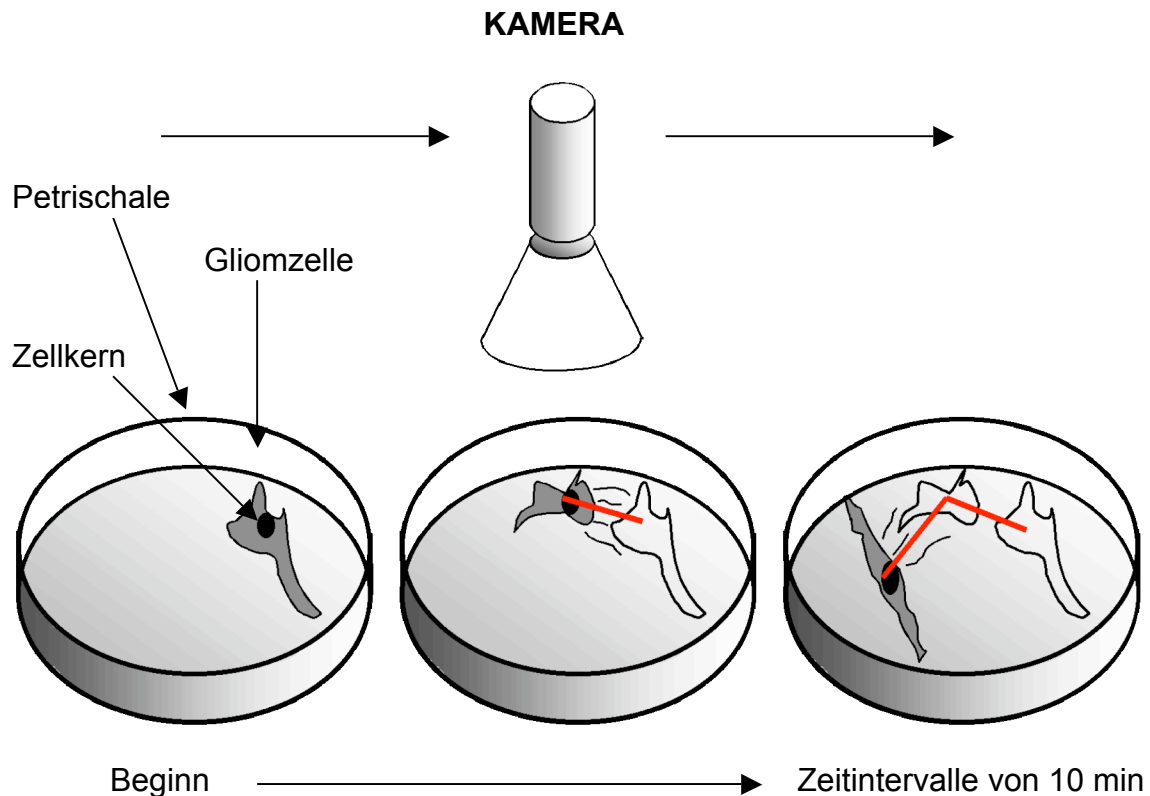
Für die Zeitraffer (Time-lapse)-Experimente wurde jeweils ca. 48 h vor dem Versuchsbeginn 1 ml einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 20.000 Zellen/ml Medium auf eine 5 cm im Durchmesser messende unbeschichtete Petrischale (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) zentral aufgebracht (Suspensionsmedium bestehend aus DMEM + 10 % FKS + 1321N1 Zellen). Nun verblieben diese vorbereiteten Petrischalen bis zum Versuchsbeginn in einem Inkubator mit kontrollierter Atmosphäre von 5 % CO₂ und 37 °C in befeuchteter Luft. Nach Ablauf der Inkubationszeit waren die Zellen auf der unbeschichteten Oberfläche angewachsen. Dann wurde das zunächst zur Suspension dienende Medium entzogen und durch 5 ml Versuchsmedium ersetzt. Dieses bestand wiederum aus DMEM und 10 % FKS zuzüglich des anteilig, je nach gewünschter Konzentration, zugeführten Blockers oder Aktivators. Die Petrischale wurde nun in eine klimakontrollierbare Mikroskopierkammer platziert. Ein die Mikroskopierkammer beheizendes Element, das die Temperatur beständig auf 37 °C hielt (tempcontrol 37-2 digital Axiovert, Carl-Zeiss Jena) und ein Gerät zur kontinuierlichen Erzeugung 5 % CO₂ haltiger befeuchteter laminarer Luftströmung (CTI Controller 3700 digital Axiovert, Carl-Zeiss Jena) sorgten während des Zeitraumes des Experimentes für eine gleich bleibende Atmosphäre wie schon im Inkubator. Nun folgte die Auswahl der zu messenden Gruppen von Einzelzellen. Diese wurden unwillkürlich ausgesucht, wobei jedoch darauf geachtet wurde, dass die ausgewählten Zellen keinen lichtmikroskopisch sichtbaren Interzellularkontakt aufwiesen. Die Positionierung und Fokussierung der Zellen wurde mit Hilfe eines Manipulators durchgeführt (Multicontrol 2000, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland), der auch während des laufenden Experiments für die automatische Fokussierung der Zellen sorgte. Durch das angeschlossene invertierte Phasenkontrastmikroskop Axiovert S 100 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit Objektiv A-Plan (10x / 0,25 Ph1 441031, Carl-Zeiss Jena, Deutschland) mit installierter Digitalkamera (Visitron Systems, Sony 3CCD Video Camera Module, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) wurden nun die Bilder über einen Hardwareadapter in einen PC mit installierter Metaview-Software (Universal Imaging Cooperation, West Chester, USA) übertragen. Diese Software ermöglichte es, mehrere Positionen auszuwählen und zu speichern, die in der Folge erneut gefunden und automatisch fokussiert werden konnten. Zum Schutz

vor Vibrationen befand sich das Mikroskop auf einem vibrationsgeschützten Mikroskopiertisch. Pro Experiment wurden 8 Positionen ausgewählt. Nach Start des zwölf Stunden dauernden Experiments wurden nun nacheinander alle Positionen angefahren, fokussiert und aufgenommen. Mit einem gewählten Intervall von 10 min wiederholte sich dieser Vorgang, so dass schließlich nach zwölf Stunden insgesamt 73 Bilder pro Position vorhanden waren. Im Intervall sorgte ein Shutter (UniBlitz / Model D122 Shutter Driver / Vincent Associates, New York, USA) für das Schließen der Blende und schützte somit die Zellen vor zusätzlichen Lichteinflüssen. Nach Abschluss einer Serie von Experimenten folgte die Auswertung. Hierzu wurde zufällig ein Experiment ausgewählt. Die 73 Bilder pro Position wurden mit Hilfe der Software zu einem Bilderstapel formatiert, der nun als Zeitrafferaufnahme in Form eines Kurzfilms zur Verfügung stand. Bild für Bild konnte jetzt die Bewegung von Einzelzellen rekonstruiert werden. Aus den pro Versuch ausgewählten 8 verschiedenen Aufnahmepositionen in der adhärennten Zellkultur wurden nun 10 Zellen ausgesucht. Zur Messung ausgewählt wurden jedoch nur die Zellen, die während des gesamten Zeitraumes das Sichtfeld nicht verließen und deren Position somit stets nachvollziehbar blieb, und die keine lange andauernden Interzellularkontakte zeigten. Nun fand die Messung der pro Intervall zurückgelegten Strecke, Zelle für Zelle und Bild für Bild durch die gesamten 73 Bilder statt. Dabei wurde die von Bild zu Bild veränderte Position des Zellkerns gemessen. Das wiederum bedeutet, dass das Ausmass der Somabewegung der beobachteten Zelle oder etwaige Membranoszillationen nicht als Migration gedeutet und damit hier nicht berücksichtigt wurden. Die pro Zelle gemessenen Einzelstrecken in Bildpunkten wurden addiert und in Mikrometer umgerechnet.

Da pro Versuchskonstellation 3 unabhängige Versuche durchgeführt wurden, lagen am Ende für jede, dem Medium zugesetzte Substanz, 30 Messergebnisse, im Sinne von über 12 h ermittelten Migrationsstrecken der Einzelzellen vor. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde schließlich aus den gesamten, während des Beobachtungszeitraumes zurückgelegten Strecken errechnet.

Danach wurden die Messergebnisse der im jeweils ausgewerteten Fall verwendeten Substanz oder der Kontrollgruppe zugeordnet.

Abb. 7: Prinzip der Messung der zurückgelegten Strecke während eines 12 h Intervalls schematisch dargestellt an einer Einzelzelle



Bei der Messung der zurückgelegten Strecke wird von Bild zu Bild die veränderte Position des Zellkerns gemessen. Etwa vorhandene Somabewegungen um den Zellkern ohne Positionsänderung des Zellkernes selbst wurden somit nicht erfasst.

4.5. Datenanalyse

Alle, aus den Messungen von 30 Zellen pro verwendete Reagenzkonzentration resultierenden Daten, sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Für Signifikanznachweise wurde, wie in der Besprechung der Experimente mit dem Institut für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Universität Jena (Jahnstr.3 07743 Jena) festgelegt, zunächst ein Boxplots zur Prüfung der Ergebnisse auf deren Verteilung durchgeführt.. Aus diesem ergab sich, dass nicht alle Stichprobenumfänge normalverteilt waren. Aus diesem Grund wurden die Signifikanznachweise mit einem Man-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei wurden die Signifikanzen der jeweils verwendeten Substanz zur Kontrollreihe untersucht. Bei einem $p < 0,05$ handelt es sich dabei um ein signifikant

unterscheidbares Ergebnis. Werte $>0,05$ sind als nicht signifikant unterschiedlich zu betrachten. Die jeweils erreichten p-Werte sind im Teil Ergebnisse gesondert verzeichnet.

Für die tabellarische Aufarbeitung der Daten und Berechnungen bezüglich der Mittelwerte, Standardabweichungen wurden die Programme Origin (Version 5.0 MicroCal Software, Inc., Northhampton, MA, USA) und Excel (Microsoft, Bellevue, WA, USA) verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen fand mit Hilfe des Programms SPSS (Chicago, Illinois, USA) statt.

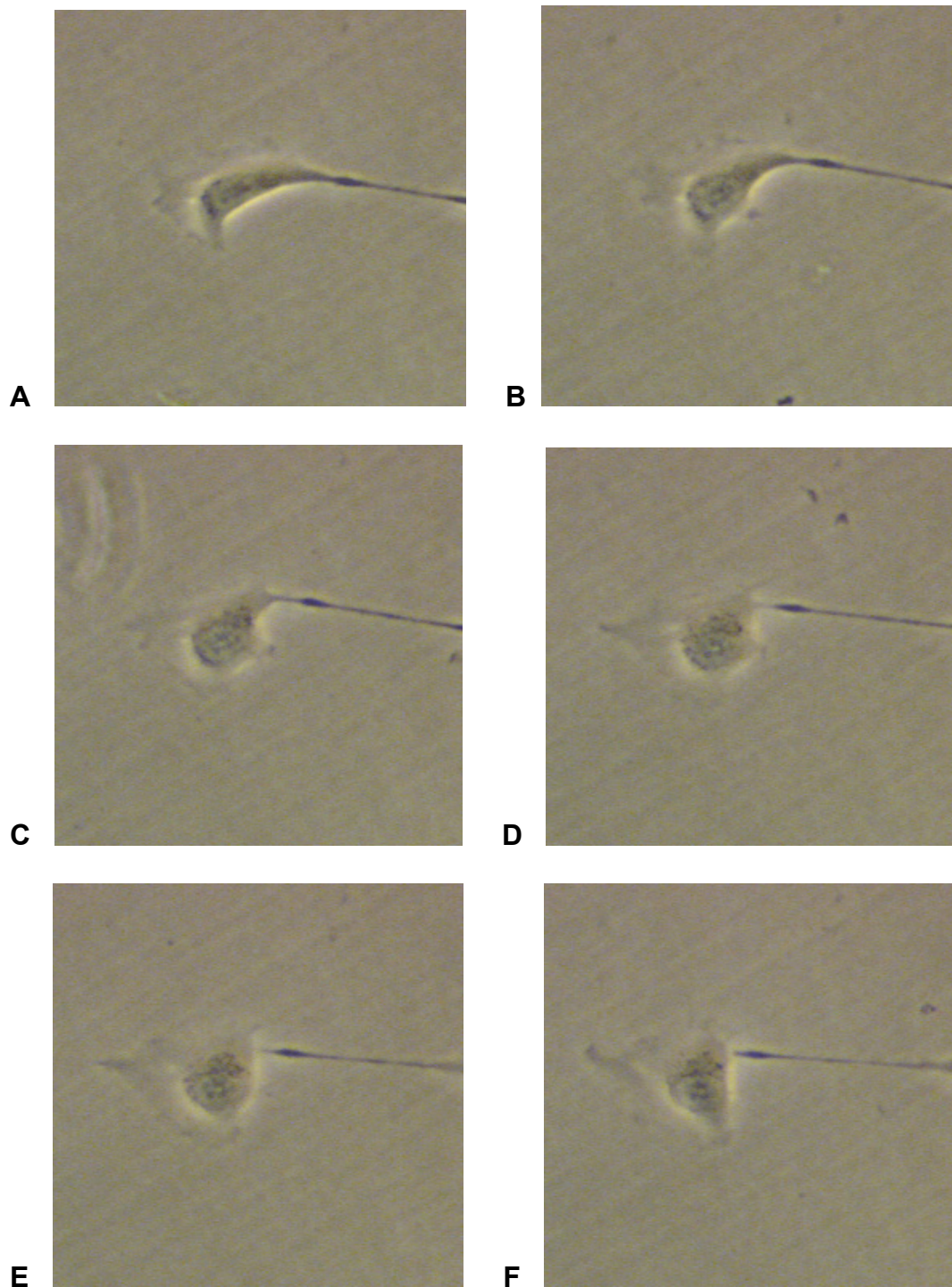
5. Ergebnisse

Voraussetzung für die Durchführung der Experimente war der Nachweis des Vorhandenseins von big conductance (BK) Kaliumkanälen in der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1. Dies wurde, wie im Abschnitt 3.2. gezeigt, anhand elektrophysiologischer Methoden bestätigt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese BK-Kanäle unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei in Gliomzellen vorkommendem Ruhemembranpotential und physiologischen intrazellulären Calciumkonzentrationen zwischen 10 nM und 1 μ M aktiv sind, bzw. aktiviert werden können.

5.1. Grundlegende Beobachtungen zur Migration an 1321N1 Gliomzellen

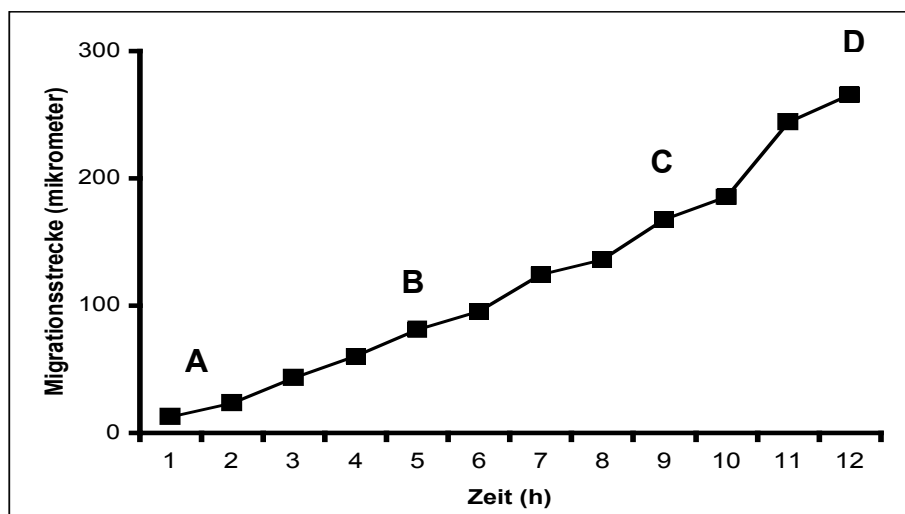
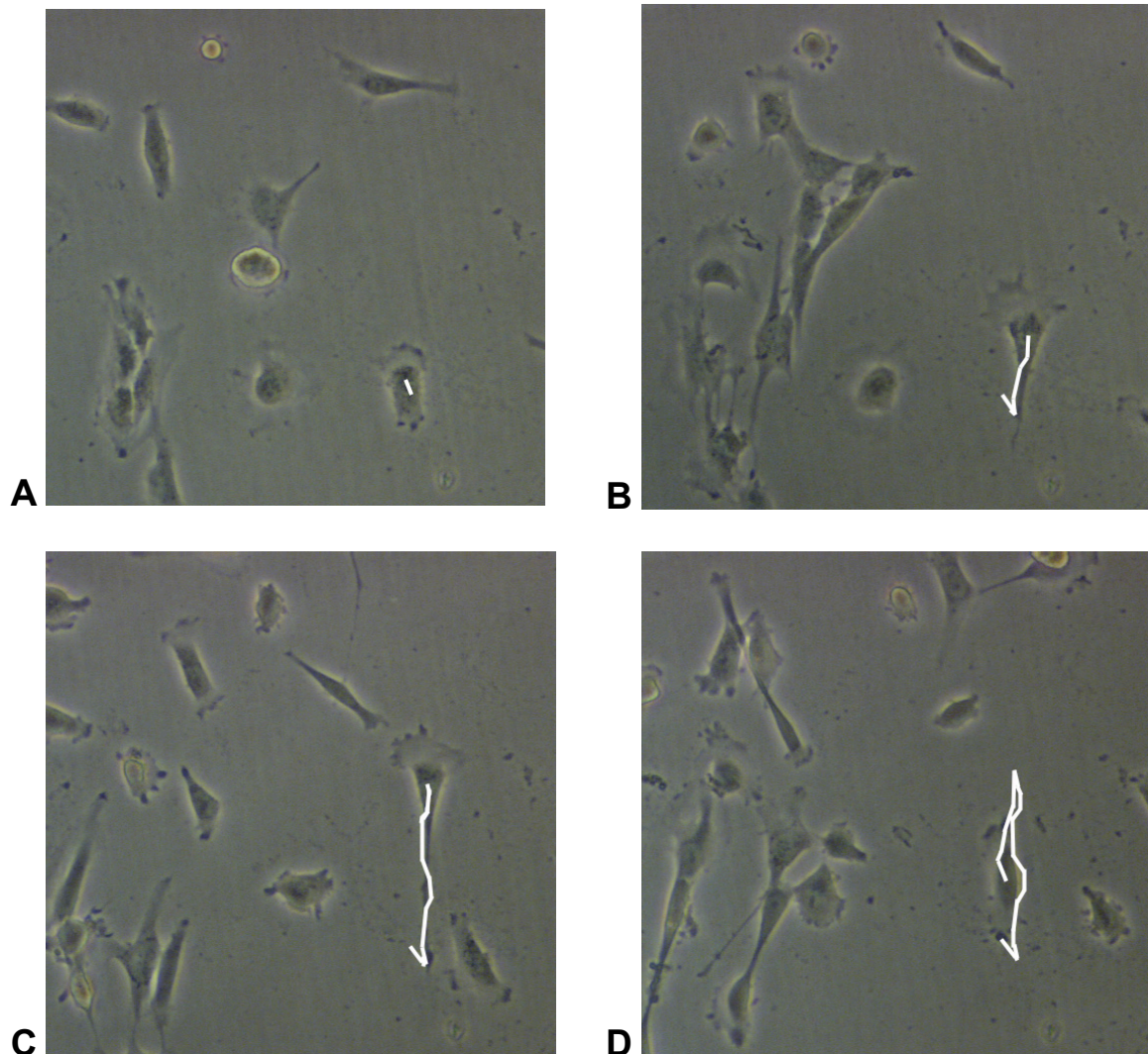
Die Migration der Zellen wurde mit Zeitraffervideosequenzen (Time-lapse Mikroskopie) untersucht. Während der Migration zeigten die Zellen morphologische Veränderungen, wie einen polarisierten Zellkörper mit sich ständig verändernden Lamellipodien am in Migrationsrichtung liegenden vorderen Zellende und einem langen, sich in Folge retrahierenden Schwanz am hinteren Ende (Abb.8). Diese Zellbewegungen, die oft auch als Oszillation ohne Positionswechsel der Zelle imponierten, konnten jedoch nicht messbar gemacht werden und wurden hier vernachlässigt. Stattdessen orientierte sich die Bewegungsmessung an der von Aufnahme zu Aufnahme jeweils nach einem Intervall von 10 min veränderten Zellkernposition. Die Abbildung 9 zeigt das Vorgehen bei Messung der migrierten Strecke einer Einzellzelle in der Kontrollgruppe. Anhand der so ermittelten Strecken konnte nun eine Gesamtstrecke über 12 h gemessen, sowie eine durchschnittliche Zellgeschwindigkeit errechnet werden, die im Folgenden als Vergleichsparameter dienen sollen.

Abb.8: Morphologische Veränderungen einer migrierenden 1321N1 humanen Gliomzelle



Die Abbildung zeigt den polarisierten Zellkörper einer Einzelzelle mit sich in Richtung der Migration ständig verändernden Lamellipodien am vorderen Zellende und einem sich in Folge retrahierenden Schwanz am hinteren Ende. Die 6 Aufnahmen repräsentieren 6 aufeinanderfolgende Bilder der gleichen Position, umfassen also einen Zeitraum von 1 Stunde.

Abb.9: Darstellung der Migration einer 1321N1 Astrozytomzelle

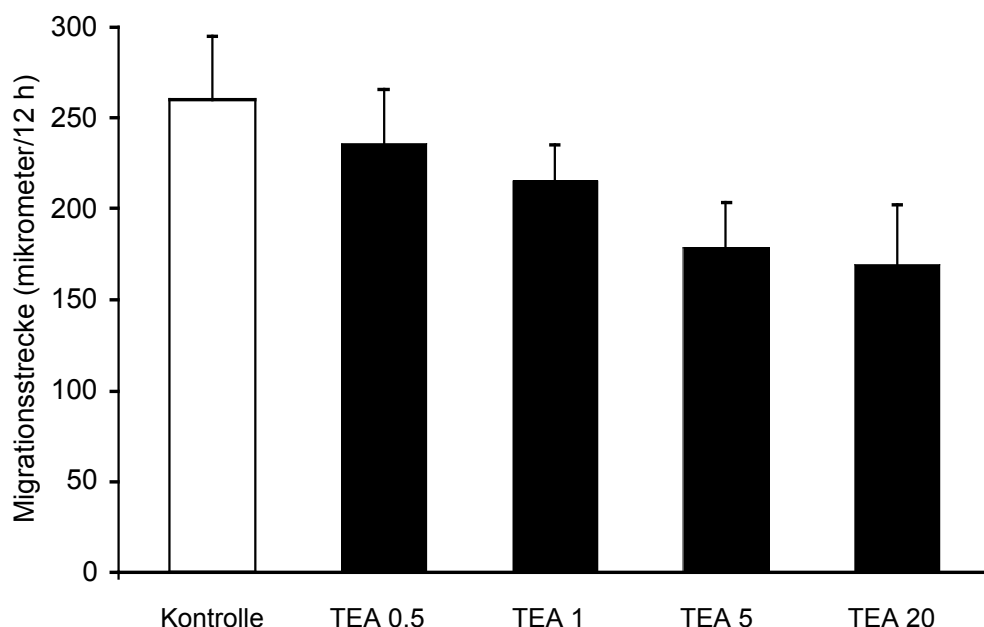


Die Migrationsstrecke einer Einzelzelle wird über einen Zeitraum von 12 h beobachtet. Zu den im Diagramm markierten Zeitpunkten A=1h, B=5h, C=9h und D=12h ist jeweils die Zelle mit der bereits migrierten Strecke (in Form einer weissen Markierung) in der entsprechenden Abbildung A, B, C oder D dargestellt.

5.2. Einfluss von BK-Kanal inhibierenden Substanzen auf die Migration

Die ersten Experimente wurden mit 3 verschiedenen spezifischen BK-Kanal Blockern, Tetraethylammonium (TEA), Iberitoxin (IBTX) und Paxilline, durchgeführt. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit aller unbehandelten Zellen (=Kontrollgruppe; n=30) betrug $21,66 \pm 6 \mu\text{m/h}$. Zunächst testeten wir TEA behandelte Zellen. Diese zeigten bei Konzentrationen von $0,5\text{mmol/l}$ ($p=0,723$) und 1mmol/l ($p=0,098$) (Zellzahl jeweils n=30), die als BK-Kanal spezifisch beschrieben werden (Lang et al., 1990), einen nicht signifikanten Einfluss ($p>0,05$) auf die Migration, mit einer Migrationsgeschwindigkeit von $19,64 \pm 3,1 \mu\text{m/h}$ für $0,5\text{mmol/l}$ TEA und $17,94 \pm 4,1 \mu\text{m/h}$ für 1mmol/l TEA. Höhere Konzentrationen von 5 ($p=0,00$) und 20mmol/l ($p=0,001$) hemmten jedoch die Migration signifikant ($p<0,05$). Die Zellen zeigten Durchschnittswerte für die Migrationsgeschwindigkeit von $14,88 \pm 3,15 \mu\text{m/h}$ für 5mmol/l TEA (n=30) und $14,08 \pm 4,5 \mu\text{m/h}$ für 20mmol/l TEA (n=20) (siehe Abb.10).

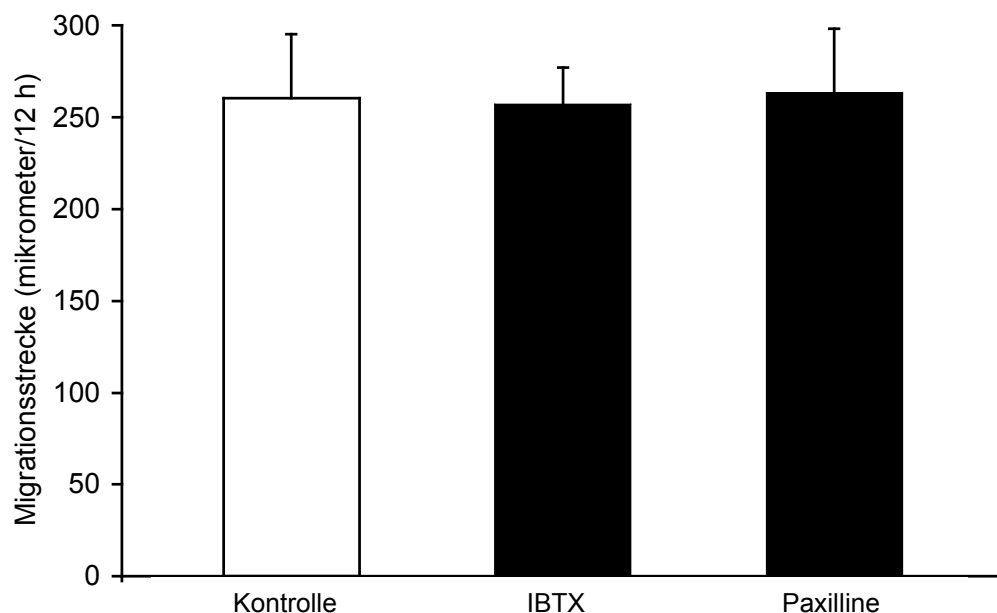
Abb. 10: Migrationsstrecke bei verschiedenen Konzentrationen des BK-Kanal Blockers TEA (0,5; 1; 5 und 20mmol/l TEA) im Vergleich zur Kontrolle



Bei den für BK-Kanäle spezifischen Konzentrationen des Inhibitors TEA von $\leq 1\text{mmol/l}$ war nur eine leichte Hemmung der Migration nachweisbar, die nicht signifikant ist ($p>0,05$). Höhere Konzentrationen von 5 und 20mmol/l zeigten jedoch eine signifikante Inhibition der Migration ($p<0,05$).

Die in den folgenden Experimenten verwendeten spezifischen BK-Kanal-Blocker Iberitoxin und Paxilline zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Migrationsstrecke im Vergleich zur Kontrolle oder untereinander ($p > 0,05$). Mit 100nM Iberitoxin ($p = 0,918$) hatten die Zellen ($n = 30$) eine Durchschnittsgeschwindigkeit von $21,43 \pm 6,2 \mu\text{m/h}$ und bei Applikation von $5 \mu\text{mol/l}$ Paxilline ($p = 0,894$) zeigten sie ($n = 30$) durchschnittlich $21,94 \pm 7,4 \mu\text{m/h}$ im Vergleich zu $21,66 \pm 6,0 \mu\text{m/h}$ bei unbehandelten Zellen ($n = 30$) (Abb. 11).

Abb. 11: Einfluss von BK-Kanal-Inhibitoren Iberitoxin (IBTX, 100nM) und Paxilline ($5 \mu\text{M}$) auf die Migrationsstrecke bei 1321N1 Zellen



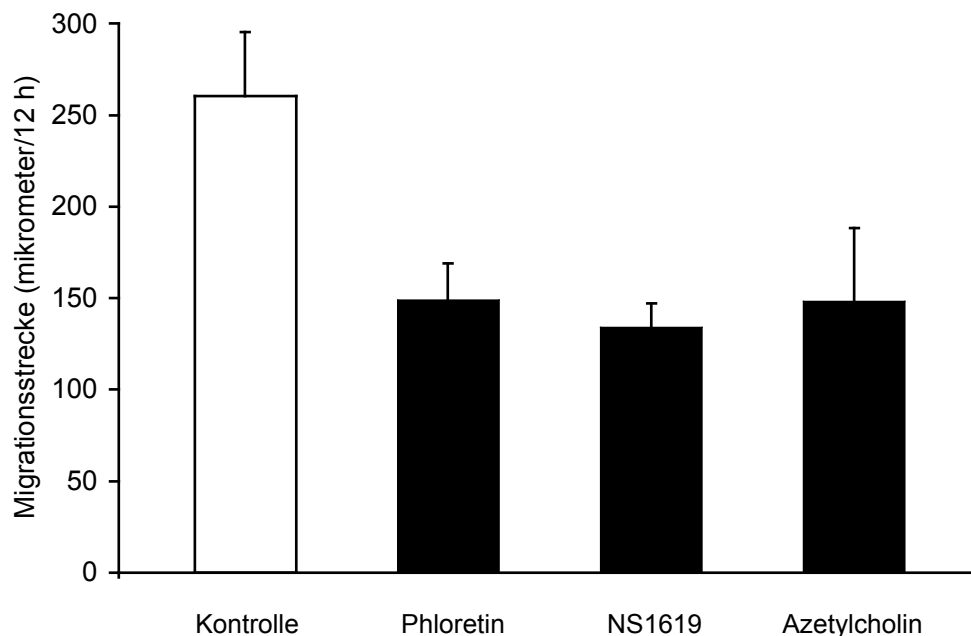
Die als spezifisch anzusehenden BK-Kanal-Blocker Iberitoxin und Paxilline zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Migration von 1321N1 humanen Gliomzellen ($p > 0,05$). Die für beide Substanzen gemessenen Strecken glichen dem Niveau der Kontrollzellen.

5.3. Einfluss von BK-Kanal aktivierenden Substanzen auf die Migration

Der nächste Schritt war die Untersuchung der BK-Kanal aktivierenden Substanzen. Dazu wurden Phloretin ($100 \mu\text{M}$) und NS1619 ($100 \mu\text{M}$) eingesetzt. Da nachgewiesenermaßen auch Azetylcholin (ACh) einen BK-Kanal aktivierenden Effekt besitzt (Bordey et al., 2000) und in entsprechend erhöhten Konzentrationen in der Zerebrospinalflüssigkeit von Hirntumoren gefunden wurde (Bychkovskii et al., 1998), fand zusätzlich diese Substanz als physiologischer BK-Kanal Aktivator in einer

Konzentration von 100 μ M Anwendung. Alle drei Substanzen führten zu einer signifikanten ($p < 0,0001$) Inhibierung der migrierten Strecken und somit der Migrationsgeschwindigkeiten von 40-50 %. Die mit Phloretin ($p = 0,00$) behandelten Zellen ($n = 30$) migrierten durchschnittlich $12,4 \pm 3,9$ μ m/h, solche die mit NS1619 ($p = 0,00$; $n = 30$) versetzt wurden $11,16 \pm 2,8$ μ m/h und Zellen ($n = 30$) deren Medium Azetylcholin ($p = 0,00$) enthielt $12,36 \pm 3,4$ μ m/h, alle Werte im Vergleich zu $21,66 \pm 6,0$ μ m/h bei den Kontrollzellen (Abb. 12).

Abb. 12: Signifikante Inhibierung der Migration unter Zugabe der BK-Kanalaktivatoren Phloretin (100 μ M), NS1619 (100 μ M) und Azetylcholin (100 μ M)

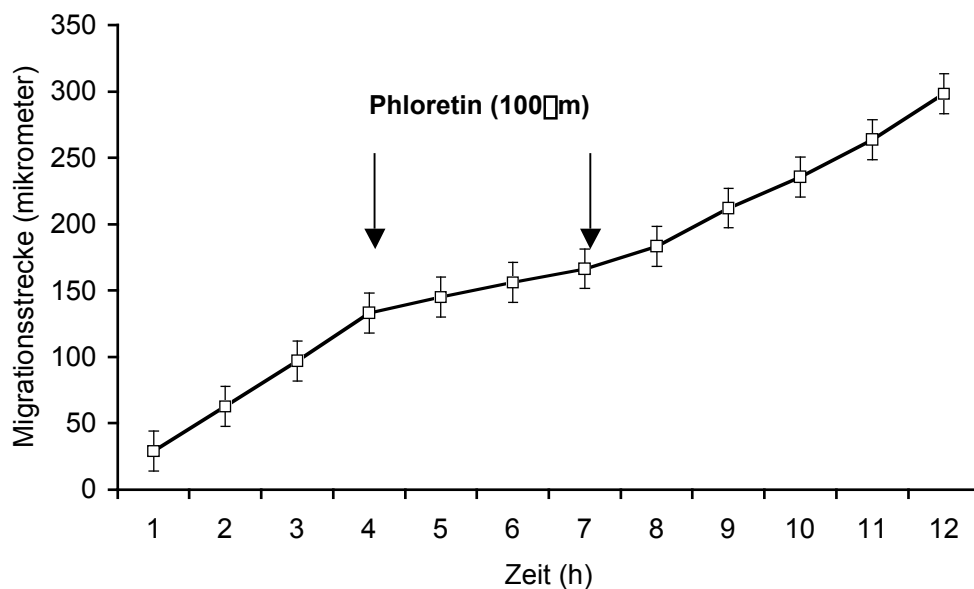


Unter Zugabe von direkten und indirekten BK-Kanal-Aktivatoren kam es zu einer signifikanten ($p < 0,0001$) fast 50 %igen Hemmung der Migration im Vergleich zur Kontrolle. Alle drei verwendeten Substanzen zeigten dabei in etwa gleiche Resultate.

Dieses Phänomen der Migrationshemmung durch Aktivierung von BK-Kanälen veranlasste uns dazu, eine Kontrolle der Reversibilität dieser Inhibierung der Migration durchzuführen. Dazu wurden Zellen ($n = 10$), die zunächst 4 h in unbehandeltem Medium beobachtet wurden für ein Zeitintervall von 3 h mit phloretinhaltigem Medium (Phloretin 100 μ M) in Kontakt gebracht, welches danach wieder gegen das Kontrollmedium ausgetauscht wurde. In diesem wurden die Zellen dann nochmals 5 h beobachtet. Diese Experimente zeigten eine vollständige Reversibilität der phloretininduzierten Migrationshemmung. Während es, wie bei den

vorher über 12 h beobachteten Zellen unter Phloretineinfluss (siehe oben) zu einer 50%igen Hemmung der Migration kam, migrierten die Zellen nach dem Ende der Phloretinexposition wieder mit etwa der gleichen Geschwindigkeit wie zu Beginn des Experimentes bzw. wie in der Kontrolle.

Abb. 13: Phloretinexposition von 1321N1 Zellen während eines bestimmten markierten Zeitintervalls - Nachweis der Reversibilität der Hemmung der Migration unter Einfluss des BK-Kanal Öffners Phloretin (100 μ M)



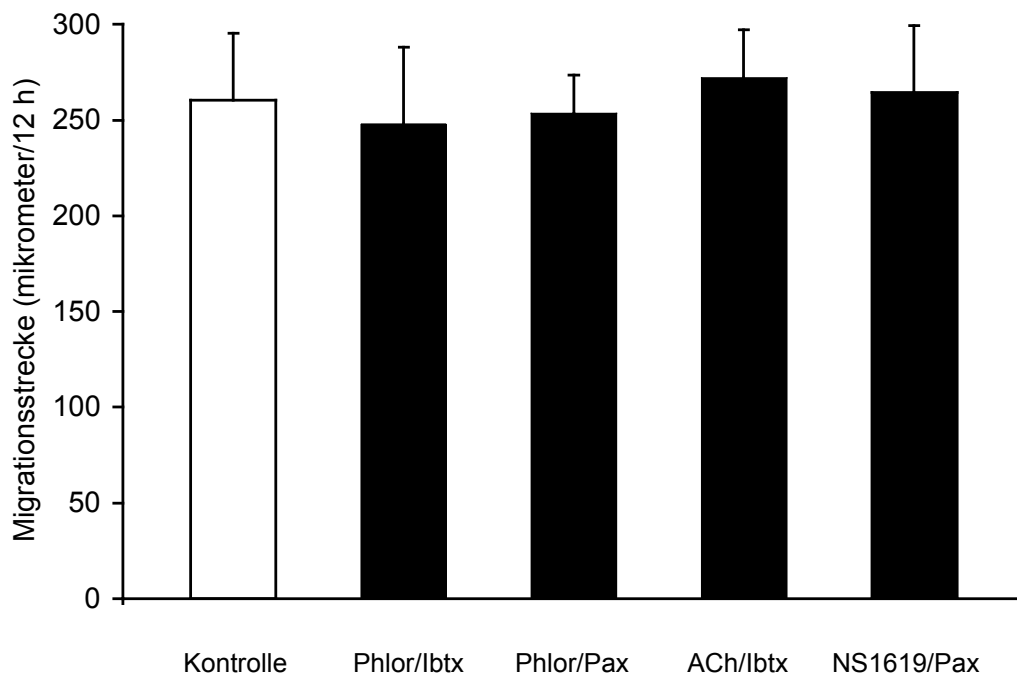
Während zu Beginn des Experimentes die 10 beobachteten Zellen im Kontrollmedium beobachtet wurden, applizierten wir nach 4 Stunden Phloretin (100 μ M) in die Badlösung. Dabei kam es wie auch in den Vorversuchen gezeigt zu einer Hemmung der Migration von mehr als 50 %. Nach Belassen des phloretinhaltigen Mediums für einen Zeitraum von 3 Stunden wurde dieses gegen das Kontrollmedium ausgetauscht. In den verbleibenden 5 h erreichten die Zellen wieder beinahe die Migrationsstrecken, wie zu Beginn des Experimentes. Es zeigte sich also eine reversible Inhibition der Migration.

In den ersten vier Stunden im Kontrollmedium hatten die Zellen (n=10) eine durchschnittliche Geschwindigkeit von $33,30 \pm 2,2 \mu\text{m/h}$. Unter Phloretin zeigten sie in den nächsten 3 Stunden eine Geschwindigkeit von $11,64 \pm 0,38 \mu\text{m/h}$. Nach Austausch des phloretinhaltigen Mediums gegen das Kontrollmedium zeigten sie in den 5 Stunden bis zur Beendigung des Experimentes eine Geschwindigkeit von $26,05 \pm 5,3 \mu\text{m/h}$ (siehe Abb. 13).

5.4. Koapplikation von BK-Kanal Aktivatoren und BK-Kanal Inhibitoren

Zusätzlich zu den Einzelexperimenten mit Aktivatoren und Inhibitoren wurden nun BK-Kanal Öffner und Blocker gemeinsam appliziert.

Abb. 14: Koapplikation von BK-Kanal aktivierenden und hemmenden Substanzen



Gliomzellen werden 12 h unter Koapplikation verschiedener Kombinationen jeweils eines BK-Kanal Aktivators und eines BK-Kanal Inhibitors beobachtet. Die verschiedenen Konstellationen sind: Phloretin (100 μ M) / Iberitoxin (100nM), Phloretin (100 μ M) / Paxilline (5 μ M), Azetylcholin (100 μ M) / Iberitoxin (100nM) und NS1619 (100 μ M) / Paxilline (5 μ M). Der offensichtlich durch BK-Kanal-Aktivierung induzierte Effekt der Migrationshemmung wird hierdurch vollständig aufgehoben. Die von den Zellen in allen 4 Experimenten migrierten Strecken entsprechen in etwa den Kontrollversuchen, d.h. sind von diesen nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$).

Dabei zeigte sich, dass die Koapplikation von BK-Kanal Aktivatoren und Inhibitoren zu einer vollständigen Aufhebung der offensichtlich durch BK-Öffnung induzierten Migrationshemmung führt. Um dies von einem zufälligen Nebeneffekt zu trennen, wurde dieses Experiment mit allen 3 BK-Kanal Öffnern (Phloretin, NS1619 und Azetylcholin) und den beiden spezifischen BK-Kanal Blockern Iberitoxin und Paxilline durchgeführt.

Alle 4 Experimente zeigten statistisch nicht signifikante ($p > 0,05$), von der Kontrolle und untereinander nicht differenzierbare Ergebnisse. Unter Applikation von Phloretin

(100 μ M) und Iberiotoxin (100nM) ($p=0,894$) hatten die Zellen ($n=30$) eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von $20,67 \pm 3,9$ μ m/h. Die gemeinsame Anwesenheit von Phloretin (100 μ M) und Paxilline (5 μ M) ($p=0,574$) im Medium erbrachte für $n=30$ $21,13 \pm 7,3$ μ m/h. NS1619 (100 μ M) und Paxilline (5 μ M) ($p=0,193$) zusammen ($n=30$) führten zu einer Geschwindigkeit von $22,03 \pm 2,9$ μ m/h und ACh (100 μ M) koappliziert mit Iberiotoxin (100nM) ($p=0,408$) zeigten $22,03 \pm 5,7$ μ m/h ($n=30$) (Abb. 14).

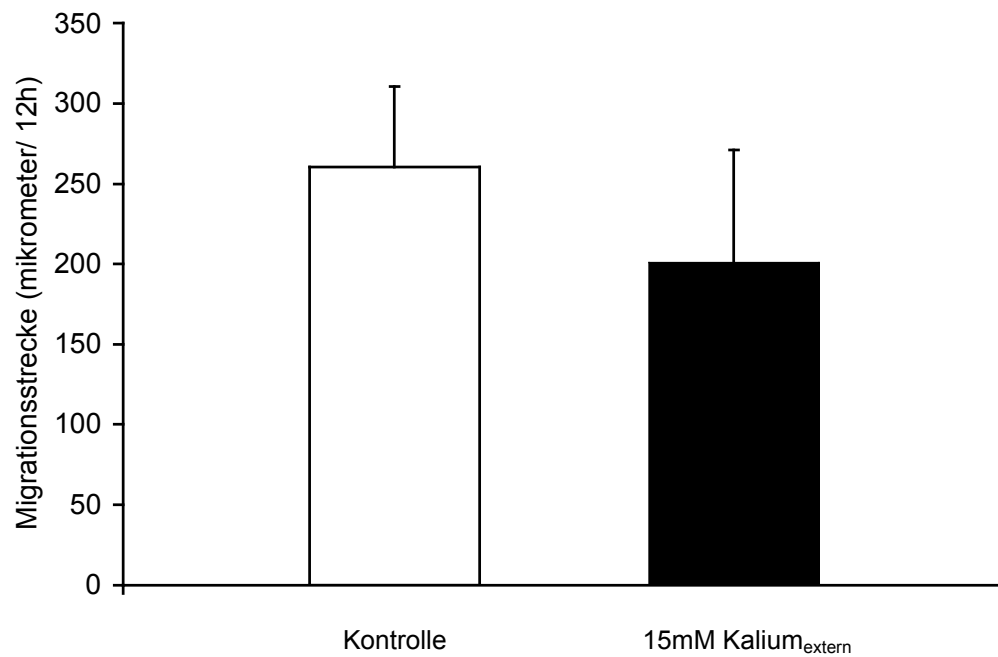
5.5. Migration von 1321N1 Zellen bei erhöhtem extrazellulärem Kalium

Da eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration in vorherigen Experimenten zu einer Zunahme der Proliferation führte (Basrai et al., 2002), wurde zusätzlich ein Versuch mit erhöhtem extrazellulärem Kalium von 15mM durchgeführt. Dies führte zu einer signifikanten ($p<0,05$) Inhibierung der Migration. Unter dem Einfluß von 15mM Kalium im extrazellulären Medium migrierten die Zellen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $13,75 \pm 6,6$ μ m/h ($p=0,045$; $n=20$). Die Kontrolle zeigte wiederum mit $21,66 \pm 6,0$ μ m/h eine deutlich höhere Geschwindigkeit (siehe Abb. 15).

5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Migrationsstudien

Resümierend kann man sagen, dass alle verwendeten BK-Kanal aktivierenden Substanzen, die BK-Öffner Phloretin und NS1619, als auch der physiologische BK-Kanal Aktivator Azetylcholin in beinahe gleichem Ausmass eine Hemmung der Migration der beobachteten Astrozytomzellen 1321N1 zeigten. Diese Migrationshemmung ist bei den hier benutzten Versuchskonstellationen als reversibel nachgewiesen worden, d.h. nach Wegnahme der BK-Kanal aktivierenden Substanz endet auch der Effekt auf die Migration. Eine Inhibierung der BK-Kanäle der Gliomzellen durch die Inhibitoren TEA, Iberiotoxin und Paxilline hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Migration. Eine Koapplikation dieser Substanzen mit BK-Kanal Aktivatoren führte darüber hinaus zu einer Aufhebung des durch die BK-Kanal Aktivatoren induzierten Effektes auf die Migration in den beobachteten Gliomzellen.

Abb.15: Einfluss von erhöhtem extrazellulären Kalium auf die Migration von 1321N1 Astrozytomzellen



Gezeigt wird hier der Vergleich von Kontrollzellen (n=30) zu Zellen (n=20), die sich in einem Medium mit 15 mM extrazellulärem Kalium befinden. Dieser Einfluss führt zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Hemmung der Migration um zirka 30 %.

6. Diskussion

6.1. Methode der Zeitraffer-Videomikroskopie

Um die Beobachtung von Einzelzellen über einen bestimmten Zeitraum zu ermöglichen, nutzten wir die Methode der Zeitraffer-Videomikroskopie (time-lapse-microscopy). Mit diesem Verfahren konnte die Bewegung der Gliomzelle kontinuierlich verfolgt, das Migrationsverhalten hinsichtlich Direktionalität beurteilt und schließlich die während des gesamten Zeitraumes zurückgelegte Strecke messbar gemacht werden. Das inzwischen gut etablierte Verfahren wurde auch von anderen Arbeitsgruppen zur Charakterisierung verschiedener Einflussfaktoren auf die Migration von Gliomzellen, die später noch näher beleuchtet werden sollen, verwendet (Soroceanu et al., 1999; Demuth et al., 2000; Werbowetski et al., 2001). Im Vergleich zu anderen Migrations-Assays wie der „Boyden-Kammer“ (Brockmann et al., 2003; Basrai Promotion, 2003) oder dem von Giese et al. 1996 verwendeten „Microliter scale migration assay“ ist es mit Hilfe der Zeitraffer-Videomikroskopie besser möglich Zellen auszuwählen und deren Verhalten über einen bestimmten Zeitraum zu verfolgen. Durch die gezielte Auswahl der gemessenen Zellen können zusätzliche Einflussfaktoren, wie z.B. lichtmikroskopisch sichtbare Interzellulärkontakte, weitgehend vermieden werden. Natürlich war eine Migrationsbeeinflussung durch von benachbarten Zellen ausgeschüttete Botenstoffe nicht verhinderbar. Da Vorversuche zeigten, dass die Zellen nach einer Ruhephase von 36-48 Stunden auch ohne Vorbeschichtung der Petrischalen mit extrazellulärer Matrix beziehungsweise einem Äquivalent (z.B. Kollagen (I,II,IV), Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Hyaluronsäure) auf dem Boden der Petrischale hafteten, verzichteten wir auf den Einsatz von extrazellulärer Matrix. Dadurch war es möglich, eine von der extrazellulären Matrix unabhängige Zellmigration zu untersuchen.

Dennoch stellt das von uns genutzte Modell zur Untersuchung des Einflusses von Ionenkanalmodulatoren auf die Migration, als einem Teil des komplexen Prozesses der Invasion, ein sehr künstliches System dar. Die Ausschaltung zusätzlicher Einflussfaktoren ermöglicht zwar eine recht spezifische Charakterisierung des Einflusses der verwendeten Modulatoren durch die veränderte Kanalaktivität auf die Migration *in vitro*, lässt aber gleichzeitig einen Rückschluss auf die Situation *in vivo* nicht zu. Das heißt, um die hier gefundenen Effekte der Kanalmodulatoren noch

besser auf die Migration von Gliomzellen übertragen zu können, müsste man die Experimente mit stärker an *in vivo* orientierten Bedingungen wiederholen (siehe Kapitel 6.4. Weiterführende Betrachtungen).

6.2. Aktivität von BK-Kanälen in 1321N1 humanen Astrozytomzellen

Wie bereits im Kapitel 3.2. erwähnt, galt es vor Beginn der Experimente sicher zu stellen, dass die zu untersuchenden 1321N1-Astrozytomzellen BK-Kanäle exprimieren und diese auch unter physiologischen Bedingungen aktiv bzw. aktivierbar sind.

Dies wurde durch die Arbeiten von Kraft und Basrai in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Kraft et al., 2001; Basrai et al., 2002). Bei schrittweiser Änderung des Membranpotentials von -80 bis $+180$ mV zeigten die Zellen bei einem Potential von -60 mV einen schnell aktivierten großen Auswärtsstrom, der über 100 ms nicht inaktivierbar war. Diese Ströme konnten als Kaliumströme identifiziert werden, da sie durch einen Austausch von Chlorid gegen Glutamat in der Badflüssigkeit nicht vermindert und durch CsCl in der Pipettenlösung vollständig aufgehoben wurden. Auch die für BK-Kanäle typische Aktivierung durch intrazelluläres Calcium wurde an 1321N1-Zellen getestet. Dabei wurden Konzentrationen von 10 nM und 1 μ M verwendet. Dieser Bereich der intrazellulären Calciumkonzentration wurde von Bordey et al. (2000) als physiologisch beschrieben. Das Ergebnis war eine für BK-Kanäle typische Linksverlagerung der IV-Kurve durch den Anstieg des intrazellulären Calciums (siehe Abb.5). Da diese nachgewiesenermaßen hohe Calciumsensitivität in 1321N1-Zellen auf der Expression der α -Untereinheit basiert, wird deren Vorhandensein auch in 1321N1-Zellen angenommen. In anderen Gliomen (Zelllinie STTG-1; Ransom et al., 2001) waren jedoch zu diesen Untersuchungen differierende Membranspannungen von $V_{0.5} + 12$ mV für eine halbmaximale BK-Kanal-Aktivierung bei oben genannten intrazellulären Calciumkonzentrationen nötig. Das lässt annehmen, dass die Calciumsensitivität zwischen einzelnen Gliomzelllinien unterschiedlich ausfallen kann. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang und wichtig für die folgenden Betrachtungen ist auch die Tatsache, dass nicht ein Anstieg des totalen zytosolischen Calciums für eine BK-Kanal-Aktivierung nötig ist, sondern bereits ein Anstieg des Calciums im submembranären Raum nahe der α -Untereinheit ausreicht (Palotta et al., 1987). Das dafür nötige Calcium liefern Calciumkanäle von extrazellulär, die sich in der Nähe des BK-Kanals befinden (Hoyer et al., 1994).

Weiterhin wurde auch eine mögliche Inhibierung dieser Ströme mit BK-Kanal-spezifischen Inhibitoren bzw. Inhibitorkonzentrationen nachgewiesen (Basrai et al., 2002). Dabei wurden die Substanzen Iberiotoxin (100 nM, BK-Kanal spezifisch) und Tetraethylammonium (1mM, BK-Kanal-spezifisch bei Konzentrationen kleiner oder gleich 1 mM (Lang et al., 1990) verwendet (siehe Abbildung 6).

Voraussetzung für eine Funktion von BK-Kanälen unter physiologischen Bedingungen in den hier untersuchten 1321N1-Zellen ist jedoch vor allem eine signifikante Öffnungswahrscheinlichkeit bei physiologischem Ruhemembranpotential. Dies wurde ebenfalls untersucht. Basrai et al. (2002) zeigten anhand eines „excised patch“-Modells bei einem Ruhemembranpotential von -20mV , typisch für Gliome (Bordey et al., 2000; Kraft et al., 2003), eine deutliche BK-Kanalaktivierung unter der oben näher beschriebenen, noch physiologischen Calciumkonzentration von $1\mu\text{M}$ (Basrai et al., 2002). Diese Ergebnisse stimmten überein mit der Arbeit von Ransom et al. (2001).

Zusammenfassend kann also unter physiologischen, aber experimentellen Bedingungen von einer möglichen Aktivierung von BK-Kanälen ausgegangen werden. Dies lässt jedoch nur sehr eingeschränkt Schlüsse auf die Aktivität *in vivo* zu. Die hier vorhandene Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren ist in der gewählten experimentellen Anordnung nur annäherungsweise simulierbar. Bei den zur Charakterisierung verwendeten „excised patch“-Experimenten wird beispielsweise die Beeinflussung der Aktivität von BK-Kanälen durch das Zytoskelett vernachlässigt. Dass diese jedoch *in vivo* eine Rolle spielt, wurde in verschiedenen Experimenten nachgewiesen. Unter dem Einfluss proteolytischer Substanzen führten Zytoskelettveränderungen zu einem leichten Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle, wohingegen „excised patches“ – und damit von der natürlichen Umgebung isolierte Kanäle – unter diesem Einfluss einen starken Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit zeigten (Benz et al., 1998). Ähnliche Resultate waren in Meningeomzellen unter Einfluss von Cytochalasin D nachweisbar, welches das Zytoskelett dissoziiert und zu einer Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit von BK-Kanälen führte (Kraft et al., 2000). Weiterhin wird die Aktivität von BK-Kanälen auch durch andere intrazelluläre Signalübertragungswege kontrolliert. Durch Proteinkinase A bedingte Phosphorylierung von intrazellulären Kanalproteinen des BK-Kanals kommt es beispielsweise zu einer Zunahme der Öffnungszeit und Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Jakab et al., 1997). Die Exposition von

glialen Müllerzellen gegenüber einem Aktivator der Proteinkinase C führte hingegen zur Inhibierung von BK-Kanälen (Schopf et al., 1999). Dies zeigt also die gegensätzliche Bedeutung der Proteinkinasen A und C für die Modulation der BK-Kanalaktivität. Einige von diesen Einflussfaktoren, die wie oben beschrieben *in vivo* von Bedeutung sind, mögen bei der BK-Kanalcharakterisierung durch Patch-clamp-Experimente vernachlässigt sein. Dennoch lässt sich aus den obigen Untersuchungen schlussfolgern, dass nicht notwendigerweise eine Membrandepolarisation für die Aktivierung des BK-Kanals erforderlich ist, sondern es ausreicht, wenn die innere Calciumkonzentration zwischen 100nM und 1µM beträgt (Basrai et al., 2002). Dies macht Sinn, da ein Ionenkanal, der starke Depolarisationen für seine Aktivierung benötigt, kaum eine physiologische Funktion in nichterregbaren Zellen, wie der hier untersuchten Gliomzelllinie, haben dürfte.

6.3. BK-Kanäle in Gliomen

In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde, wie bereits im Kapitel 1.3.1.3. ansatzweise erwähnt, ein Zusammenhang der Aktivität von BK-Kanälen und der Proliferation von humanen Gliomzellen festgestellt. Dabei zeigten Basrai et al. (2002), dass eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums auf Werte zwischen 5mM und 20mM zu einer Zunahme der Proliferation um 20% führten. Diese Kaliumwerte werden aufgrund der Nekroseprozesse in der Umgebung von Hirntumoren zeitweise als physiologisch vermutet, auch wenn dafür keine konkreten Daten existieren (Ransom et al., 2001; Basrai et al., 2002). Dieser Kaliumanstieg führt durch eine Depolarisation der Zellmembran auch gleichzeitig zu einer Aktivierung von BK-Kanälen (Ransom et al., 2001). Wurden diese durch die BK-spezifischen Inhibitoren Iberitoxin (100nM) oder TEA (1mM) gehemmt, war die erhöhte Proliferation unter sonst gleichen Bedingungen nicht nachweisbar (Basrai et al., 2002). Der unter physiologischen Verhältnissen aktive BK-Kanal spielt also nachweislich eine regulierende Rolle bei der Proliferation von Gliomen.

Außer der Proliferation haben die Prozesse der Zellbewegung und Invasion zentrale Bedeutung für die Malignität von Gliomen. Einen Zusammenhang dieser Prozesse mit der Aktivierung von BK-Kanälen durch Muskarin stellten Bordey et al. (2000) her. Diese Arbeit brachte erstmals den BK-Kanal in den Vordergrund der Betrachtung zur Zellmigration bei malignen Hirntumoren.

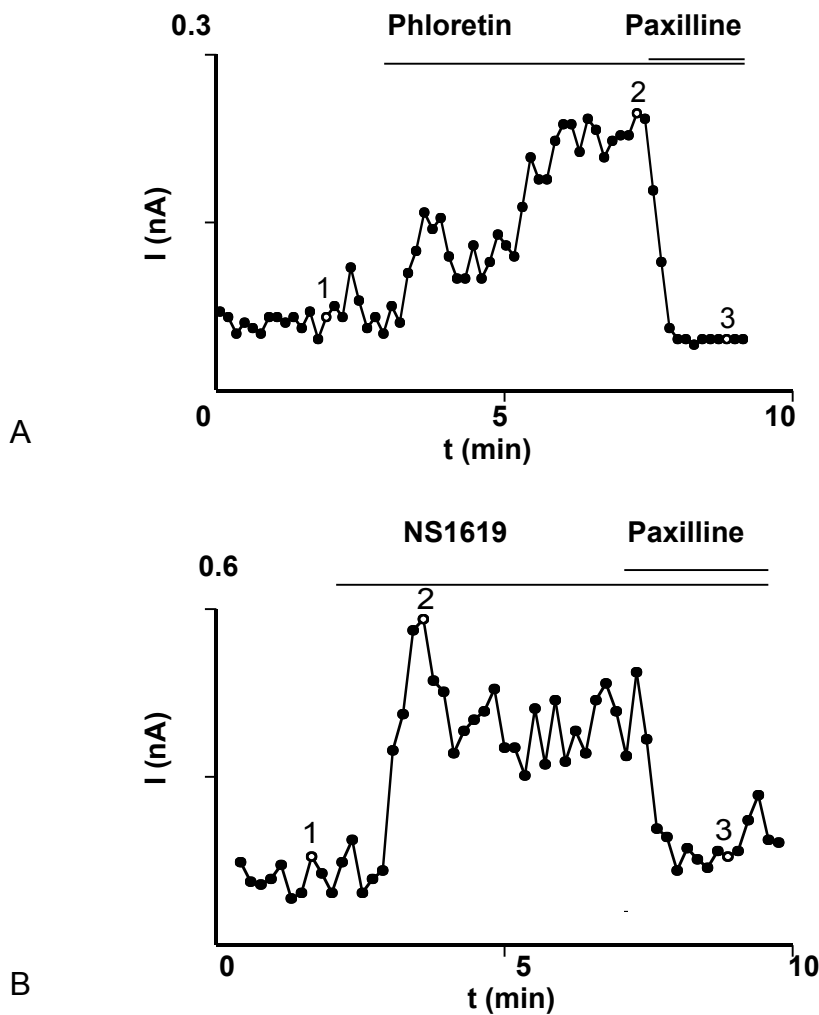
6.3.1. Bedeutung von BK-Kanälen für die Zellmigration

Im Liquor von Patienten mit primären Hirntumoren wurden interessanterweise erhöhte Spiegel von Azetylcholin gefunden (Bychkovskii et al., 1998). Diese Substanz ist bekannt als starkes Mitogen für Gliomzellen (Guizetti et al., 1997). Ein möglicher Einfluss von Azetylcholin auf die Migration wurde erstmals von Bordey et al. (2000) untersucht. Diese wiesen an der Gliomzelllinie U373 nach, dass es durch Muskarin, einem Agonisten an muskarinischen Azetylcholinrezeptoren, zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern kommt, welche zu einer *indirekten* Aktivierung von Calcium- abhängigen BK-Kanälen führt. Gleichzeitig hemmt die Gabe von Muskarin die Migration der untersuchten Gliomzellen. Die längere Konfrontation der Zellen mit hohen Azetylcholinkonzentrationen führte überdies zu Calciumoszillationen und Membranoszillationen. Durch die Zugabe von Atropin (10nM), einem Antagonisten muskarinischer Azetylcholinrezeptoren, waren sowohl der Calciumanstieg als auch die Kaliumströme nicht mehr nachweisbar. Der in niedrigeren Konzentrationen BK-Kanal-spezifische Blocker TEA wurde hier in einer hohen Konzentration von 20 mM eingesetzt und blockte so nicht nur die Kaliumströme, sondern auch den Calciumanstieg, möglicherweise gar durch einen Antagonismus am Azetylcholinrezeptor (Bordey et al., 2000).

Unklar in der Arbeit von Bordey et al. (2000) bleibt, in wie weit die durch die Agonisten Azetylcholin und Muskarin hervorgerufene *indirekte* BK-Kanalaktivierung auch für die Migrationshemmung in den Gliomzellen verantwortlich ist.

Um diese Frage näher zu betrachten, war es nötig, nach Substanzen zu suchen, die möglichst durch *direkten Angriff* am Kanal die Aktivität des BK-Kanals beeinflussen. Somit könnte man den Effekt der Migrationshemmung bei gleichzeitiger BK-Kanalaktivierung dann auf die BK-Kanalaktivität zurückführen. Dies war sehr gut möglich, da für den BK-Kanal eine Reihe sehr spezifischer Aktivatoren und Inhibitoren zur Verfügung stehen.

Abb.16: Einfluss von BK-Kanal-Aktivatoren auf Auswärtsströme in 1321N1-Zellen



Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von Auswärtsströmen in humanen 1321N1-Astrozytomzellen bei einer Membranspannung von +80 mV durch die Applikation der Aktivatoren Phloretin (100 μ M; A), NS1619 (100 μ M; B) und des Blockers Paxilline (1 μ M) in einem konventionellen Ganzzell-Experiment (Patch-clamp). Die Ströme wurden jeweils durch Applikation von Paxilline inhibiert. Die intrazelluläre Calciumkonzentration betrug 50 nM (modifiziert nach Kraft et al., 2003).

Die von uns in den Migrationsversuchen verwendeten Konzentrationen der Aktivatoren Phloretin und NS1619 erzeugten in den elektrophysiologischen Experimenten Auswärtsströme, die durch Zusatz von Paxilline, einem als BK-spezifisch bekannten Inhibitor, vollständig gehemmt wurden (Abb.16) (Kraft et al., 2003). Daraus schlussfolgerten wir, dass es sich bei Phloretin und NS1619 in der Tat um effektive Aktivatoren des BK-Kanals handelt.

Als nächstes untersuchten Kraft et al. (2003) den phloretininduzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Es zeigte sich nur ein geringer Anstieg und dieser wurde nicht durch weitere Versuche in Calcium-freier Lösung beeinflusst. Auch durch zusätzliche Applikation von Paxilline blieb die durch Phloretin induzierte intrazelluläre Calciumerhöhung bestehen, ist demnach nicht von der Aktivität des BK-Kanals abhängig. Dieser Calciumanstieg scheint also aus intrazellulären Calciumspeichern herzurühren. Ein möglicher minimaler Anteil der BK-Kanal-Aktivierung, die durch intrazelluläre Calciumerhöhung hervorgerufen wird, ist damit nicht auszuschließen (Kraft et al., 2003). Ein ähnlicher Effekt von NS1619, welches in glatten Muskelzellen zu einer partiellen Aktivierung des BK-Kanals durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt, ist bekannt (Yamamura et al., 2001). Die hauptsächliche Beeinflussung der Aktivität des BK-Kanals durch die beiden aktivierenden Substanzen Phloretin (100 μ M) und NS1619 (100 μ M) findet jedoch auf *direktem* Wege statt. Das bedeutet, dass die beiden Substanzen eine bestimmte Bindungsstelle am BK-Kanal besitzen und darüber *direkt* die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals regulieren (Yamamura et al., 2001). Durch diese direkte Einflussnahme auf die Aktivität eines Ionenkanals erhofften wir uns, präzisere Aussagen über die Beteiligung von BK-Kanälen an Migrationsprozessen treffen zu können. Die in der vorliegenden Arbeit mit diesen beiden *direkten* Aktivatoren des BK-Kanals an 1321N1 humanen Gliomzellen durchgeführten Zeitraffer-Experimente zeigten eine beinahe 50%ige Inhibierung der von den Gliomzellen migrierten Strecke. Dieser Effekt auf die Migration als auch die bei BK-Kanal-Aktivierung nachweisbaren Kaliumströme waren unter der zusätzlichen Zugabe der BK-Kanal-Blocker Iberiotoxin (100 nM) und Paxilline (5 μ M) nicht mehr nachweisbar. Im Folgenden verwendeten wir die Substanz Azetylcholin (100 μ M), die, wie von Bordey et al. (2000) gezeigt, ebenfalls zu einer BK-Kanalaktivierung führt. Obwohl die Aktivierung von BK-Kanälen durch Azetylcholin nachweislich über eine Erhöhung von intrazellulärem Calcium stattfindet, Azetylcholin also ein *indirekter* BK-Kanalaktivator ist, fand sich ein beinahe identisches Resultat bezüglich der Migrationsbeeinflussung verglichen mit den anderen verwendeten *direkten* Aktivatoren. Auch hier war eine Inhibierung der Migration von fast 50% nachweisbar und auch der migrationshemmende Einfluss von Azetylcholin war durch den Inhibitor Iberiotoxin (100 nM) vollständig reversibel. Der unterschiedliche Mechanismus der Aktivierung der BK-Kanäle spielte also keine Rolle für den migrationshemmenden Effekt der aktivierten BK-Kanäle. Überdies

schließt die strukturelle Unterschiedlichkeit von NS1619, Phloretin und Azetylcholin und der beinahe identische Grad der Migrationshemmung einen unspezifischen Effekt dieser Substanzen auf die Zellmigration mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung des BK-Kanal offensichtlich die Migration der Gliomzellen verlangsamt, und zwar unabhängig von der Art des zugrunde liegenden Mechanismus.

Bei den BK-Kanal hemmenden Substanzen handelt es sich ausschliesslich um *direkt* extrazellulär am Kanal angreifende Substanzen (Candia et al., 1992; Gribkoff et al., 1996). Die alleinige Zugabe BK-Kanal inhibierender Substanzen wie Tetraethylammonium zum Medium in für BK-Kanäle typischen Konzentrationen von 0,5 mM und 1 mM (Lang et al., 1990; Ransom et al., 2001) erbrachte keine signifikante Veränderung der Migrationsstrecke während des beobachteten Zeitintervalls von 12 h. Höhere Konzentrationen, die nachgewiesenermaßen auch andere Ionenkanäle beeinflussen (Basrai et al., 2002), zeigten bei 5 mM und 20 mM eine Abnahme der migrierten Strecke. Die Ergebnisse der BK-Kanal spezifischen Konzentrationen sind vergleichbar mit den Resultaten der Experimente mit den Blockern Iberiotoxin und Paxilline. Auch diese Substanzen zeigten in BK-Kanal spezifischen Konzentrationen keinerlei Veränderung der Migrationsstrecke der beobachteten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Letztendlich verwundert ein fehlender Effekt der BK-Kanal blockierenden Substanzen jedoch nicht, wenn man bedenkt, dass BK-Kanäle in nicht stimulierten Zellen normalerweise ohnehin geschlossen sind (Kraft et al., 2003). Der *direkte* Einfluss von Iberiotoxin auf die BK-Kanal-Aktivität darf dabei als sehr spezifisch gesehen werden, da für diese Substanz keine weiteren direkten Effekte bekannt sind. Für die *direkt* hemmende Substanz Paxilline in einer Konzentration von 5 μ M scheint der von anderen Autoren beschriebene (Longland et al., 2000) hemmende Einfluss auf den Inositol 1,4,5-triphosphate Rezeptor, der mit einer Verminderung der intrazellulären Calciumfreisetzung verbunden ist, keine Rolle für die Gliomzellmigration zu spielen.

Da in der Arbeit von Basrai et al. (2002) der Einfluss einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Proliferation charakterisiert wurde, war auch ein möglicher Effekt von erhöhtem extrazellulären Kalium auf die Migration von Interesse. Während bei den Proliferationsversuchen von Basrai et al. (2002) die mit einer Zunahme der BK-Kanal-Aktivität verbundene erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zu einer Proliferationszunahme um zirka 20% führte, zeigte sich bei

den hier durchgeführten Migrationsversuchen mit 15 mM extrazellulärem Kalium eine deutliche Verminderung der von den Zellen zurückgelegten Strecken. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der reduzierten Migrationsgeschwindigkeit nach Applikation der direkten BK-Kanal-Aktivatoren. Außerdem zeigen die Experimente mit erhöhtem extrazellulärem Kalium, daß Migration und Proliferation der Gliomzellen durch die BK-Kanal-Aktivierung antagonistisch beeinflusst wird.

6.3.2. Mögliche Mechanismen der Migrationsbeeinflussung durch BK-Kanäle

Der genaue Mechanismus, wie es zu einer BK-Kanal-abhängigen Hemmung der Migration kommt, ist nach wie vor nicht geklärt. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen BK-Kanäle ohne zusätzliche Stimulation inaktiv sind (Kraft et al., 2003).

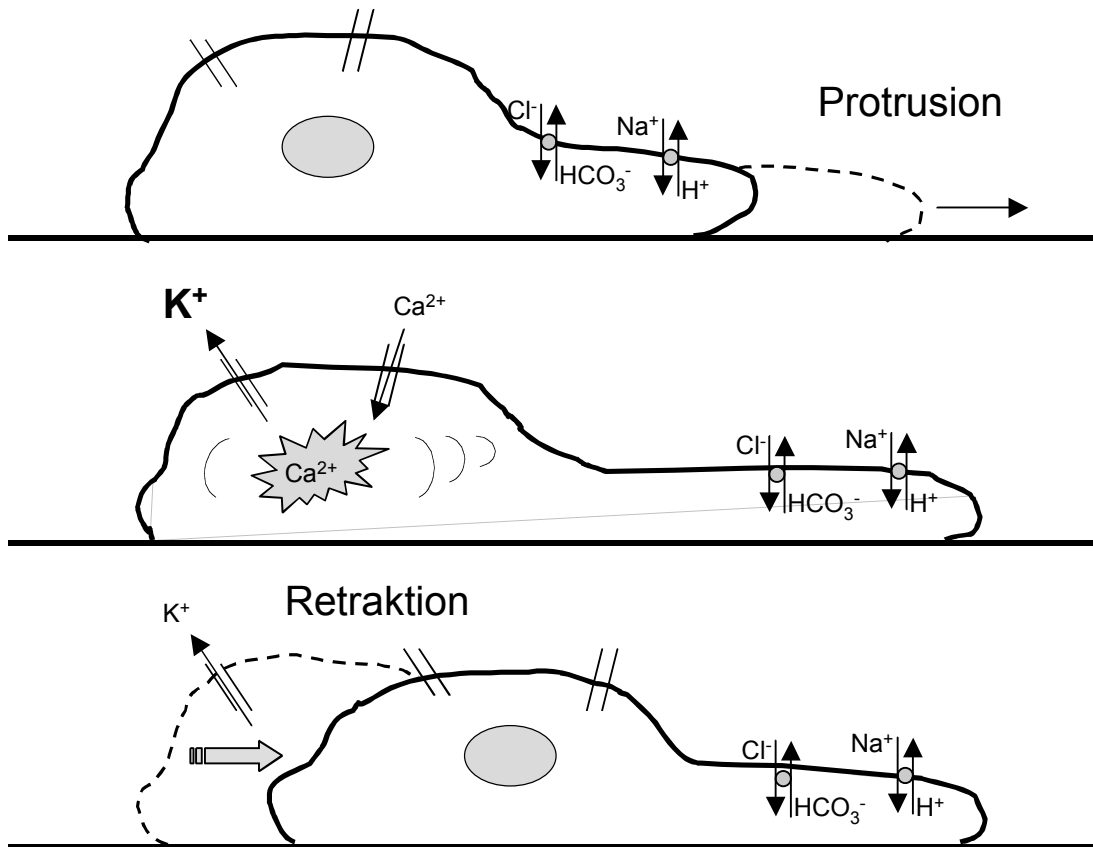
Kommt es durch externe Stimuli, wie erhöhtes extrazelluläres Kalium oder durch Azetylcholin, wie *in vivo* für Hirntumoren angenommen oder aber auch durch die hier genutzten direkten Aktivatoren NS1619 und Phloretin zu einer Aktivierung des BK-Kanals, so führt dies zu einer Zunahme des Kaliumflusses aus der Zelle. Dies resultiert in einer Hyperpolarisation der Zellmembran, das heißt das Membranpotential wird negativer. Das wiederum würde den Calcium-Einstrom durch spannungsunabhängige Calcium-durchlässige Kanäle unterstützen. Dies wäre von Bedeutung, wenn der Zusammenhang zwischen BK-Kanal-Aktivität und Migrationsbeeinflussung durch eine Modulation des Zytoskeletts durch Veränderungen des intrazellulären Calciumgehaltes hervorgerufen werden würde. In den von Kraft et al. (2003) durchgeführten Experimenten war jedoch kein signifikanter Calciumeinstrom in 1321N1 Zellen unter lang andauernder Stimulation mit Phloretin nachweisbar. Auch eine zusätzliche Applikation von 10% fötalem Kälberserum, welches gewöhnlich in Migrationsversuchen benutzt wird, zeigte keine Veränderung des Calciumeinstromes. Es ist allerdings denkbar, dass der durch die Öffnung der BK-Kanäle bedingte Einstrom von Calcium nur zu einem auf submembranären Bereiche beschränkten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Dieser Anstieg würde sich möglicherweise nicht in Form einer starken Erhöhung des gesamten intrazellulären Calciums im Zytosol niederschlagen. Solche Veränderungen des intrazellulären Calciums, die nur bestimmte Gebiete der Zelle, zum Beispiel den submembranären Raum betreffen, könnten allerdings ausreichend sein, um zu einer Modulation der Migration zu führen, da die funktionelle Polarisierung von

zytoskelettalen Mechanismen auch durch einen Gradienten des intrazellulären Calciums aufrechterhalten wird (Schwab et al., 2001a ; Kraft et al., 2003).

Auch andere Arbeitsgruppen, wie Schwab et al. (1996; 1999; 2001a), sehen einen ähnlich funktionierenden Einfluss Calcium-abhängiger Kaliumkanäle auf die Migration. Eine polarisierte Verteilung des Kanals in der Zelle führt über eine zu bestimmten Zeitpunkten vorkommende Aktivitätsänderung zu zyklischen Volumenveränderungen der Zelle. Diese Veränderungen des Zellvolumens führen möglicherweise durch Calcium vermittelt zu Depolymerisationen und Polymerisationen des Actins und damit einer Alteration des Zytoskeletts, welche die direkte treibende Kraft für die Migration darstellt. Diese Mechanismen funktionieren aber nur durch eine ständige Aktivitätsänderung des Kanals. Wird die Öffnung der Kanäle dauerhaft aktiviert, so wird der Migrationsprozess gehemmt (Schwab et al., 1999; 2001a).

Demgegenüber fanden sich in unserer Arbeit Indizien dafür, dass der Anstieg des intrazellulären Calciums durch Phloretin nicht für die Inhibierung der Migration verantwortlich zu machen ist. Das lässt sich daraus schließen, dass die durch Phloretin-Applikation erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration bei zusätzlicher Zugabe von Paxilline erhöht blieb, während die phloretininduzierte Hemmung der Migration durch Paxilline aufgehoben wurde. Das würde bedeuten, dass der von Bordey et al. (2000) beschriebene Zusammenhang von erhöhtem intrazellulären Calcium und einer Migrationshemmung von Gliomzellen auf eine Aktivierung von BK-Kanälen durch das erhöhte intrazelluläre Calcium zurückgeführt werden müsste und möglicherweise kein direkter Effekt des Calciums auf das Zytoskelett wäre.

Abb. 17: Zusammenfassendes Modell zur Funktion von Ionenkanälen in migrierenden Zellen



Modell, welches die derzeitigen Vorstellungen zur Funktion von Ionenkanälen in migrierenden Zellen subsummiert. Salz-, gefolgt von osmotisch bedingter Wasseraufnahme, vermittelt durch Ionenaustauscher $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ und Na^+/H^+ führt an der Spitze der Zelle zu einer Ausstülpung eines Lamellipodiums. Der Anstieg des Zellvolumens, beziehungsweise der Membranspannung triggern nun, möglicherweise vermittelt durch dehnungsaktivierte, Ca^{2+} durchlässige Kationenkanäle einen Anstieg des intrazellulären Calciums. Dies führt zusammen mit dem Ausfluss von Kaliumionen und der gleichzeitigen Zellschrumpfung zu einer Retraktion am Zellende (modifiziert nach Schwab 2001a+b).

6.3.3. Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Migration bei Gliomen

Die in dieser Arbeit gezeigte Inhibierung der Migration durch BK-Kanal-aktivierende Substanzen und der von unserer Arbeitsgruppe und anderen Arbeiten beschriebene, die Proliferation hemmende Einfluss von BK-Kanal inhibierenden Stoffen (Basrai et al., 2002) oder der proliferationsfördernde und den Zellzyklus antreibende Einfluss von BK-Kanal-aktivierenden Stoffen (Liu et al., 1998; Vaur et al., 1998; Wiecha et al., 1998), decken sich mit der von Bordey et al. (2000) gemachten Entdeckung eines „Entweder-oder“-Phänomens der Beeinflussung von Proliferation und Migration durch

den Aktivitätszustand von BK-Kanälen. Von anderen Autoren wird diese Situation auch als „Gehen-oder-Wachsen“ („go-or-grow“)-Theorie bezeichnet (Berens et al., 1990; Merzak et al., 1994; Koochekpour et al., 1995; Chicoine und Silbergeld, 1997). Das bedeutet, dass sich Zellen entweder teilen und proliferieren oder migrieren und somit in umgebendes Gewebe ausbreiten, nicht aber beides zur gleichen Zeit tun. Ein Wachstumsstimulator wie Azetylcholin (Guizetti et al., 1997; Bordey et al., 2000) würde also indirekt die Migration hemmen, da er ja die Proliferation fördert. Dies stellt natürlich eine für therapeutische Überlegungen äußerst prekäre Situation dar. Den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zur Folge würde also eine Hemmung der BK-Kanalaktivität auch die Proliferation hemmen, die Migration jedoch scheinbar nicht beeinflussen. Umgekehrt würde eine BK-Kanalaktivierung zwar die Migration hemmen, die Proliferation jedoch sogar noch fördern. Mit Blick auf eine mögliche therapeutische Anwendung von BK-Kanal-Öffnern als migrationshemmende Substanzen ist deren Wirkung auf die Proliferation von Gliomzellen zu prüfen. Entsprechende Experimente mit Phloretin, NS1619 oder weiteren BK-Kanal-Aktivatoren sind bisher weder an Gliom- noch an anderen Tumorzellen durchgeführt worden.

Ähnlich gegenteilige Einflüsse auf die einander ausschließenden Phänomene Migration und Proliferation sind von Giese et al. (1996) in Abhängigkeit von Extrazellulärmatrix und Zelldichte beschrieben worden. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mit ihren Protein- und Nicht-Protein-Komponenten kontrolliert viele Aspekte des Zellverhaltens wie Differenzierung, Proliferation, Zellform und Migration (Lin und Bissell, 1993; Giese et al., 1994). Vermittelt über Integrin-Rezeptoren, einer Gruppe zellulärer Adhäsionsmoleküle, die an die extrazelluläre Matrix binden (Hynes, 1987; Edvardsen et al., 1994), kommt es nicht nur zur Haftung der Zellen an der extrazellulären Matrix, sondern je nach Substrat auch zur direkten Steuerung von Migration. Giese et al. (1996) stellten diesen unterschiedlichen Einfluss an den zwei Proteinen der extrazellulären Matrix Merosin und Vitronectin dar. Während die Zellen auf Merosin deutlich stärker migrierten, zeigten Zellen die auf eine Vitronectin-Matrix aufgebracht wurden, einen proliferativeren Phänotyp. Überschritten die Zellpopulationen auf beiden Matrixproteinen eine bestimmte Zelldichte, näherten sich die Proliferationsraten wieder aneinander an und der migrationsfördernde Einfluss war nicht mehr nachweisbar. Die Autoren schluss-

folgerten daraus, dass höhere Zelldichte und migrationshemmende Substanzen zu einem stärker proliferierenden Zelltyp führen, während die aktive Migration die Proliferation unterdrückt.

Insgesamt kann man sagen, dass die durch eine veränderte extrazelluläre Matrix, Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptoren an der Zelloberfläche beeinflusste Adhäsion von Gliomzellen in Hinsicht auf eine Migrationsbeeinflussung bereits recht gut untersucht ist (Giese et al., 1994, 1996; Okada et al., 1996; Haughland et al., 1997; Zhang et al., 1998; Akiyama et al., 2001). Es zeigte sich, dass die extrazelluläre Matrix in der Umgebung von Gliomzellen eine andere Zusammensetzung hat als in gesundem Gewebe. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Gliomzellen in der Lage sind, die Zusammensetzung ihrer umgebenden Extrazellulärmatrix zu modellieren und dadurch zur Förderung von Migration und Invasion beizutragen (Gladson, 1999; Belot et al., 2001).

Auch Prozesse der enzymatischen Veränderung und Eröffnung des Raumes in welchen sich die Bewegung der Zellen richtet, sind charakterisiert worden. Hier spielt vor allem die Expression und Aktivitätsmodulation von Matrix-Metalloproteinasen eine Rolle (Bodey et al., 2000; Kondraganti et al., 2000; Wick et al., 2001).

Bisher gab es jedoch nur wenige Untersuchungen dahingehend, welche Veränderungen zur Generierung von Bewegung in Gliomzellen im Vergleich zu normaler Glia in solch unterschiedlichem Ausmaß führen, und welche Prozesse es auf zellulärer Ebene ermöglichen, durch die engen Interzellularräume zu migrieren. Die hier vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Modifikation der Aktivität eines einzelnen Ionenkanals *in vitro* einen klaren, spezifischen Effekt auf die Migrationsstrecke von Gliomzellen hat. Dabei kann allerdings davon ausgegangen werden, dass dieser Kanal unter *in vivo*-Bedingungen für die tumorbiologisch maßgebliche Migrationsbeeinflussung sicher nur einen Baustein von mehreren darstellt. In wie fern dieser aber möglicherweise eine Schlüsselposition einnimmt, ist in weiteren Experimenten zu prüfen.

In glialen Müllerzellen beispielsweise wurde der Aktivität von BK-Kanälen eine solche „Schalterfunktion“ eingeräumt, indem sie eine Schlüsselposition für die proliferative Gliose von Müllerzellen einnimmt (Bringmann et al., 2002).

6.4. Weiterführende Betrachtungen

Da *in vivo* jedoch multiple Faktoren (Kaczarek et al., 1999), wie oben beschrieben, im Kontext betrachtet werden müssen, wäre nun nachzuweisen, ob der bei den von uns durchgeführten *in vitro*-Experimenten nachweisbare deutliche Effekt der BK-Kanalmodulation auch *in vivo* eine Rolle spielt und wenn ja, in welchem Ausmaß. Um diese *in vivo* Bedingungen ansatzweise zu simulieren, könnte man die hier vorgestellten Experimente in einer Kokultur – bestehend aus einem Gliomsphäroid und einem Aggregat aus Hirngewebe – erneut wiederholen. Solche Kokulturen wurden bereits Anfang der 90er Jahre etabliert (vergleiche: Bjerkvig et al., 1990). Ein Sphäroid aus Gliomzellen würde es zum einen ermöglichen, die dritte Dimension der Migration mit zu erfassen, die in unseren Experimenten nicht messbar war. Weiterhin würde eine Kokultur die Möglichkeit bieten, auch Aussagen über die Invasionsbeeinflussung durch die vorgenommene Kanalmodulation zu treffen. Solche Migrationsassays sind für Gliome bereits etabliert, ohne dass dabei der Einfluss spezieller Substanzen gemessen wurde. De Bouard et al. (2002) arbeiteten mit verschiedenen Gliomspezies und implantierten diese in Hirnscheiben von Nagetieren. Mit Hilfe von Immunhistochemie oder Fluoreszenz gelang der Nachweis der invadierten Tumorzellen in den Hirnscheiben. Khoshyomn et al. (1998) etablierten ein Kokultur-System von Hirnaggregaten aus fetalen Rattenzellen und Glioblastomsphäroiden. Diese wurden mit den vitalen Membranfluoreszenzfarbstoffen DiO und Dil gefärbt, wodurch Migration und Invasion der Glioblastomzellen sichtbar gemacht werden konnte. Penar et al. (1998) zeigten das erste Mal an solchen Kokulturen den Einfluss modifizierender Substanzen auf die Migration bzw. Invasion. In diesem Fall führte die Hemmung einer Tyrosinkinase zur Hemmung der Migration.

Sollten auch diese Experimente mit Kokulturen den von uns gezeigten Einfluss der Ionenkanalmodulation auf die Migration und möglicherweise auch auf die Invasion zeigen, dann wäre noch ein *in vivo* Versuch am Tiermodell sinnvoll. Dabei gilt es zu bedenken, dass generell Schwierigkeiten bestehen, die Invasion eines humanen Tumors im Tiermodell zu etablieren, da viele dieser humanen Tumoren kein immunologisch kompetentes tierisches Gewebe invadieren (Penar et al., 1998). Andererseits ist es jedoch schwierig tumorbiologische Eigenschaften eines humanen Glioms in einem Tierversuch mit implantierten Rattengliomzelllinien zu imitieren (vergleiche: Whittle et al., 1998). Bereits durchgeführt wurden solche Experimente

von Engebraaten et al. (1999). Diese implantierten Sphäroide aus Gliomzelllinien und Tumorbiopsien in Hirne von Ratten und wiesen dort ein Wachstum und eine Invasion nach.

Bei allen diesen Versuchen gibt es jedoch bisher keinen, bei dem gleichzeitig die Wirkung ionenkanalmodifizierender Substanzen untersucht wurde. Da solche Kanäle ubiquitär in den meisten Organen exprimiert werden, bestünde hier die zusätzliche Schwierigkeit, die modifizierende Substanz stereotaktisch in den Tumor applizieren zu müssen, um eine generalisierte Wirkung zu vermeiden.

Auch bei der Erforschung der Mechanismen, mit denen der BK-Kanal die Migration beeinflusst, gilt es noch viele Lücken zu schließen. Es wären beispielsweise weitere Studien nötig, um die Rolle des BK-Kanals für den Calcium-Einstrom in die Zelle und die Volumenregulation der Zelle besser zu beleuchten. Weiterhin könnte eine Messung von Zytoskelettveränderungen unter Modulation der BK-Kanalaktivität einen direkteren Zusammenhang der BK-Kanal-Aktivität zu Tage führen. Damit wäre der Mechanismus, mit der der BK-Kanal die Migration von Gliomzellen beeinflusst, möglicherweise besser verständlich.

7. Literaturverzeichnis

1. Akiyama Y., Jung S., Salhia B., Lee S., Hubbard S., Taylor M., Mainprize T., Akaishi K., van Furth W., Rutka J.T. (2001) Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *J Neuroonc* 53:115-127
2. Basrai D., Kraft R., Bollensdorff C., Liebmann L., Benndorf K., Patt S. (2002) BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport* 13:403-407
3. Behrens R., Nolting A., Reimann F., Schwarz M., Waldschutz R., Pongs O. (2000) hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett* 474:99-106
4. Belot N., Rorive S., Doyen I., Lefranc F., Bruyneel E., Dedecker R., Micik S., Brothi J., Decaestecker C., Salmon I., Kiss R., Camby I. (2001) Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. *Glia* 36:375-390
5. Benz I., Meyer D.K., Kohlhardt M. (1998) Properties and cytoskeletal control of Ca^{2+} -independent large conductance K^{+} channels in neonatal rat hippocampal neurons. *J Membrane Biol* 161:275-286
6. Berens M.E., Rutka J.T., Rosenblum M.L. (1990) Brain tumor epidemiology, growth and invasion. *Neurosurg Clin N Am* 1:1-18
7. Berens M.E., Rief M.D., Loo M.A., Giese A. (1994) The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in microliter scale assay. *Clin Exp Metastasis* 12:405-15
8. Berens M.E. and Giese R. (1999) "... those left behind." *Biology and Oncology of Invasive Glioma Cells. Neoplasia* 1:208-219

9. Bjerkvig R., Tonnesen A., Laerum O.D., Backlund E.O. (1990) Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *J Neurosurg* 72:463-475
10. Blatz A.L., Magleby K.L. (1987) Calcium activated potassium channel. *TINS* 10, No 11
11. Bodey B., Bodey B.Jr., Siegel S.E., Kaiser H.E. (2000) Matrix metalloproteinase expression in childhood astrocytomas. *Anticancer Res* 20:3287-3292
12. Bordey A., Sontheimer H., Trouslard J. (2000) Muscarinic Activation of BK Channels induces Membrane Oscillations in Glioma Cells and Leads to Inhibition of Cell Migration. *J Membrane Biol* 176:31-40
13. Bordey A., Sontheimer H. (1998) Electrophysiological Properties of Human Astrocytic Tumor Cells In Situ: Enigma of Spiking Glial Cells. *The American Physiological Society* 2782-2793
14. Bregestovski P.D., Printseva O.Y., Serebryakov V., Stinnakre J., Turmin A., Zamoyski V. (1988) Comparison of Ca^{2+} dependent K^{+} channels in the membrane of smooth muscle cells isolated from adult and fetal human aorta. *Pfluegers Arch* 413:8-13
15. Brenner R.: <http://physiology.uthscsa.edu/faculty/brenner.html>
16. Brenner R., T.J. Jegla, A. Wickenden, Y. Liu and RW Aldrich (2000a) Cloning and functional characterization of large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* 275:6453-61
17. Brenner R., Perez G.J., Bonev A.D., Eckman D.M., Kosek J.C., Wiler S.W., Patterson A.J., Nelson M.T., Aldrich R.W. (2000b) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:870-876

18. Bringmann A., Francke M., Pannicke T., Biedermann B., Kodal H., Faude F., Reichelt W., Reichenbach A. (2000) Role of glial K-Channels in ontogeny and gliosis, a hypothesis based upon studies on Muller cells. *Glia* 29:35-44
19. Bringmann A., Pannicke T., Weick M., Biedermann B., Uhlmann S., Kohen L., Wiedemann P., Reichenbach A. (2002) Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Muller (glial) cells. *Glia* 37:139-52
20. Brismar T. (1988) Inward K-current in human malignant glioma cells: possible mechanism for K homoeostasis in the brain. *Acta Physiol Scand* 132:259-260
21. Brismar T. (1995) Physiology of Transformed Glial Cells. *GLIA* 15:231-243
22. Brismar T., Collins V.P. (1989) Potassium and Sodium channels in human malignant glioma cells. *Brain Research* 480:259-267
23. Brismar T., Collins V.P. (1988) Inward rectifying potassium channels in human malignant glioma cells. *Brain Research* 480:249-258
24. Brockmann M.A., Ulbricht U., Gruner K., Fillbrandt R., Westphal M., Lamszus K. (2003) Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* 53:1391-1399
25. Brzezinska A.K., Gebremedhin D., Chilian W.M., Kalyanaraman B., Elliott S.J. (2000) Peroxynitrite reversibly inhibits Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1883-90
26. Bychkovskii V.N., Pleshtis S.A., Sobeshchanskii G.V. (1998) Neurohumoral shifts in brain tumor patients. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko* 7:983-992

27. Candia S., Garcia M.L., Latorre R. (1992) Iberitoxin, a potent blocker of the large-conductance Ca^{+} -activated K^{+} -channel. *Biophys. J* 63:583-590
28. Chicoine M., Silbergeld D. (1995a) Modification of Human Glioma Locomotion On Vitro by Cytokines EGF, BFGF, PDGF, NGF, and TNF alpha. *J Neurosurgery* 36:1165-1171
29. Chicoine M., Silbergeld D. (1995b) Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *J Neurosurg* 82:615-622
30. Chicoine M., Silbergeld D. (1997) Mitogens as Motogens. *J of Neurooncology* 35:249-257
31. Chin L.S., Park C.C., Zitmay, Sinha, Dipatri, Perillan, Simard (1997) 4-aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K-channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurol Res* 48:122-127
32. Condeelis J. (1993) Life at the leading edge: formation of cell protrusions. *Annu Revu Cell Biol* 9:411-444
33. Conley (1996) Ion Channel Factsbook–Intracellular Ligand Gated Channels. Academic Press
34. De Bouard S., Christov C., Guillamo J.S., Kassar-Duchossoy L., Palfi S., Leguerinel C., Masset M., Cohen-Hagenauer O., Peschanski M., Lefrancois T. (2002) Invasion of human glioma specimens in cultures of rodent brain slices: a quantitative analysis. *J Neurosurg* 97:169-176
35. DeCoursey T.E., Kim S.Y., Silver M.R., Quandt F.N. (1996) Ion channel expression in PMA/differentiated human THP-1 macrophages. *J Membr Biol* 152:141-157

36. Demuth T., Hopf N.J., Kempfski O., Sauner D., Herr M., Giese A., Perneczky A. (2000) Migratory activity of human glioma cell lines in vitro assessed by continuous single cell observation. *Clin Exp Metastasis* 18:589-597
37. Edvardsen K., Pedersen P.H., Bjerkvig R., Hermann G.G., Zeuthen J., Laerum O.D., Walsh F.S., Bock E. (1994) Transfection of glioma cells with the neural adhesion molecule NCAM: effect on glioma cell invasion and growth in vivo. *Int J Cancer* 58:116-122
38. Engebraaten O., Hjortland G.O., Hirschberg H., Fodstad O. (1999) Growth of precultured human glioma specimens in nude rat brain. *J Neurosurg* 90:125-132
39. Feldkamp M.M., Lau N., Guha A. (1997) Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. *J Neurooncol* 35:223-248
40. Fernandez C., Figarella-Branger D., Girard N., Bouvier-Labit C., Gouvernet J., Paz Paredes A., Lena G. (2003) Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors-a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 53:544-55
41. Galvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J.P., Roy-Constancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1990) Purification and characterisation of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from the venom of the scorpion *Buthus ramulus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090
42. Giese A., Rief M.D., Loo M.A., Berens M.E. (1994) Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res* 54:3897-3904
43. Giese A., Loo M.A., Tran N., Haskett D., Coons S.W., Berens M.E. (1996) Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer* 67:275-282
44. Gladson C.L. (1999) The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1029-1040

45. Golding N.L., Jung H.Y., Mickus T., Spruston N. (1999) Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 19:8789-98
46. Greenberg, M.S. (2001) Tumor. In: *Handbook of Neurosurgery* 386-505. Ed M. S. Greenberg. Georg Thieme Verlag: Stuttgart Ref ID:176
47. Gribkoff V.K., Lum-Ragan J.T., Boissard C.G., Post-Munson D.J., Meanwell N.A., Starrett J.E. Jr., Kozlowski E.S., Romine J.L., Trojnacki J.T., McKay M.C., Zhong J., Dworetzky S.I. (1996) Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium- activated potassium channels. *Mol Pharmacol* 5:206-217
48. Guizetti M., Costa P., Peters J., Costa L.G. (1997) Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur J Pharmacol* 297:265-273
49. Haughland H.K., Tysnes B.B., Tysnes O.B. (1997) Adhesion and migration of human glioma cells are differently dependent on extracellular matrix molecules. *Anticancer Res* 17:1035-1043
50. Heinemann S., F.S.-Universität Jena, Deutschland: http://www2.uni-jena.de/GK_BiomolekulareSchalter/
51. Herrera G.M., Heppner T.J., Nelson M.T. (2000) Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:60-8
52. Hille B. (1992) *Ionic channels in excitable membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland
53. Hoyer J., Distler A., Haase W., Gogelein H. (1994) Ca^{2+} influx through stretch activated cation channels activates maxi K^{+} channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2367-2371.

54. Hurley B.R., Preiksaitis H.G., Sims S.M. (1999) Characterization and regulation of Ca⁺-dependent K⁺ channels in human esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* 276:G843-G852
55. Hynes R.O. (1987) Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554
56. ICI Pharmaceuticals Ltd. UK, <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl5.html>
57. International Union of basic and clinical Pharmacology (2002) contact : University of California, Irvine CA 92697
58. Jakab M., Weiger T.M., Hermann A. (1997) Ethanol activates maxi Ca²⁺-activated K⁺ channels of clonal pituitary (GH3) cells. *J Membr Biol* 157:237-245
59. Jan L.Y., Jan Y.N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol* 505:267-282
60. Kaczarek E., Zapf S., Bouterfa H., Tonn J.C., Westphal M., Giese A. (1999) Dissecting glioma invasion : interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype. *Int J Dev Neurosci* 17:625-641
61. Kaczorowski G.J., Knaus H.G., Leonard R.J., McManus O.B. and Garcia M.L. (1996) High Conductance Calcium activated Potassium Channels; Structure, Pharmacology and Function. *J of Bioenergetics and Biomembranes* 28
62. Khoshyomn S., Penar P.L., McBride W.J., Taatjes D.J. (1998) Four-dimensional analysis of human brain tumor spheroid invasion into fetal rat brain aggregates using confocal scanning laser microscopy. *J Neurooncol* 38:1-10
63. Kleihues P., Soylemezoglu F. (1995) Histopathology, Classification, and Grading of Gliomas. *Glia* 15:211-221

64. Kleihues P., Cavenee W.K. (2000) Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon
65. Knaus H.G., Garcia-Calvo M., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1994) Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J Biol Chem* 269:3921-3924
66. Knaus H.G., McManus O.B., Lee S.H., Schmalhofer W.A., Garcia Calvo M., Helms L.M.H., Sanchez M., Giangiacomo K., Reuben J.P., Smith III A.B., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1994) Tremorgenic indole alkaloids potentially inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33:5819-5828
67. Komuro H., Yacubova E., Rakic P. (2001) Mode and Tempo of Tangential Cell Migration in the Cerebellar External Granular Layer. *J Neurosci* 21:527-540
68. Kondraganti S., Mohanam S., Chintala S.K., Kin Y., Jasti S.L., Nirmala C., Lakka S.S., Adachi Y., Kyritsis A.P., Ali-Osman F., Sawaya R., Fuller G.N., Rao J.S. (2000) Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res* 60:6851-6855
69. Koochekpour S., Merzak A., Pilkington G.J. (1995) Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer* 31A:375-380
70. Kraft R., Benndorf K., Patt S. (2000) Large Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels in Human Meningioma Cells. *J Membrane Biology* 175:25-33
71. Kraft R., Basrai D., Schmid U., Patt S. (2001) Differential expression of potassium currents and effect of potassium channel blockers on the proliferation of 1321N1 astrocytoma cells. *Pflugers Arch* 441:R247

72. Kraft R., Krause P., Jung S., Basrai D., Liebmann L., Bolz J., Patt S. (2003) BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 446:248–255
73. Lang D.G., Ritchie A.K. (1990) Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels in a pituitary cell line. *J Physiol* 425:117-132
74. Latorre R. (1989) Ion channel modulation by divalent cations. *Acta Physiol Scand Suppl* 582:13
75. Lauffenburger D.A., Horwitz A.F. (1996) Cell migration. A physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369
76. Lin C.Q., Bissell M.J. (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 7:737-743
77. Liu X., Chang Y., Reinhart P.H., Sontheimer H. (2002) Cloning and Characterization of Glioma BK, a Novel BK Channel Isoform Highly Expressed in Human Glioma Cells. *The Journal of Neuroscience* 22:1840-1849
78. Longland C.L., Dyer J.L., Michelangeli F. (2000) The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Eur J Pharmacol* 408:219-225
79. Louis D.N., Holland E.C., Cairncross J.G. (2001) Glioma Classification – A Molecular Reappraisal. *American Journal of Pathology* 159
80. McLendon R.E., Halperin E.C. (2003) Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated? *Cancer* 98:1745-1748
81. McManus O.B. (1991) Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J Bioenerg Biomembr* 23:537-560.

82. McManus O., Helms L.M.H., Pallanck L., Ganetzky B., Swanson R., Leonard R.J. (1995) Functional Role of beta Subunit of High Conductance Calcium-Activated Potassium Channel. *Neuron* 14:645-650
83. Merzak A., McCrea S., Koocheckpour S., Pilkington G.J. (1994) Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta. *Br J Cancer* 70:199-203
84. Merzak A., Pilkington G.J. (1997) Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. *Cancer Metastasis Rev* 16:155-177
85. Mitchinson T.J., Cramer L.P. (1996) Actin based cell motility and cell locomotion *Cell* 84:371-379
86. Nazzaro J.M., Neuwelt E.A. (1990) The role of surgery in management of supratentorial intermediate and high grade astrocytomas in adults. *J Neurosurg.* 73:331-344
87. Nolte C., Kirchhoff F., Kettenmann H. (1997) Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells in vitro: evidence for EGF receptor expression. *European Journal of Neuroscience* 9:1690-1698
88. Okada H., Yoshida J., Sokabe M., Wakabayashi T., Hagiwara M. (1996) Suppression of CD44 expression decreases migration and invasion of human glioma cells. *Int J Cancer* 66:255-260
89. Ordaz B., Vaca L., Franco R., Pasantes-Morales H. (2004) Volume changes and whole cell membrane currents activated during gradual osmolarity decrease in C6 glioma cells. Contribution of two types of K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 21 (electronic publication ahead of print!)
90. Palotta B.S., Hepler J.R., Oglesby S.A., Harden T.K. (1987) A comparison of calcium activated potassium channel currents in cell-attached and excised patches. *J Gen Physiology* 89:985-997

91. Pasantes-Morales H., Murray A.R., Lilja L., Moran J. (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: I. Potassium and Chloride- activated permeability. *Am J Physiology* C165-C171
92. Pasantes-Morales H., Morales Mulia S. (2000) Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86:414-27
93. Patterson A.J., Henri-Olson J., Brenner R. (2002) Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med* 12:78-82
94. Penar P.L., Khoshyomn S., Bhushan A., Tritton T.R. (1998) Inhibition of glioma invasion of fetal brain aggregates. *In Vivo* 12:75-84
95. Peppelenbosch M.P., Tertoolen L.G., de Laat S.W. (1991) Epidermal growth factor activated calcium and potassium channels. *J Biol Chem* 266:19938-19944
96. Petkov G.V., Bonev A.D., Heppner T.J., Brenner R., Aldrich R.W., Nelson M.T. (2001) Beta1-Subunit of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 537:443-452
97. Pilkington G.J. (1994) Tumour Cell Migration in the Central Nervous System. *Brain Pathology* 4:157-166
98. Pilkington G. J. (1997) The Paradox of Neoplastic Glial Cell Invasion of the Brain and Apparent Metastatic Failure. *Anticancer Research* 17:4103-4106
99. Poolos N.P., Johnston D. (1999) Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 19:5205-12
100. Ransom C., Sontheimer H. (2001) BK Channels in Human Glioma Cells. *J of*

Physiology 85:790-803.

101. Ransom C.B., Liu X., Sontheimer H. (2002) BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity. *Glia* 38:281-291
102. Reinhardt J., Golenhofen N., Pongs O., Oberleithner H., Schwab A. (1998) Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci* 95:5378-5382
103. Robitaille R., Charlton M.P. (1992) Presynaptic calcium signalling and transmitter release are modulated by calcium activated potassium channels. *J Neurosci* 12:297-305
104. Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Charlton M.P. (1993) Functional colocalization of calcium and calciumgated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11:645-655
105. Rondé P., Giannone G., Gerasymova I., Stoeckel H., Takeda K., Haiech J. (2000) Mechanism of calcium oscillations in migrating human astrocytoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498:273-280
106. Schopf S., Bringmann A., Reichenbach A. (1999) Protein kinases A and C are opponents in modulating glial Ca²⁺ -activated K⁺ channels. *Neuroreport* 10:1323-1327
107. Schreiber M., Yuan A., Salkoff L. (1999) Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neuroscience* 2:416-421
108. Schwab A., Oberleithner H. (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *J Physiology* 432:R87-R93
109. Schwab A., Schuricht B., Seeger P., Reinhardt J., Dartsch P.C. (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K-channel modulation of actin cytoskeleton and cellvolume . *J Physiology* 438:330-337

110. Schwab A. (2001a) Ion Channels and Transporters on the Move. *News Physiol Sci* 16:29-33
111. Schwab A. (2001b) Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F739-F747
112. Shapiro W.R., Shapiro J.R. (1998) Biology and treatment of malignant glioma. *Oncology* 12:233-240
113. Soroceanu L., Manning T., Sontheimer H. (1999) Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl and K Ion Channel Blockers. *J of Neuroscience* 19:5942-5954
114. Suguira Y., Shimada H., Seeger R.C., Laug W.E., DeClerck Y.A. (1998) Matrix metallo proteinases -2 und -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 58:2209-2216
115. Turnheim K., Constantin J., Chan S., Schultz S.G. (1989) Reconstitution of a calcium-activated potassium channel in basolateral membranes of rabbit colonocytes into planar lipid bilayers. *J Membr Biol* 112:247-254
116. Tseng-Crank J., Foster C.D., Krause J.D., Mertz R., Godinot N., DiChiara T., Reinhart P.H. (1994) Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron* 13:1315-1330.
117. Tseng-Crank J., Godinot N., Johansen T.E., Ahring P.K., Strobaek D., Mertz R., Foster C.D., Olesen S.P., Reinhart P.H. (1996) Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K⁺ channel beta-subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci* 93:9200-9205

118. Valverde M.A., Rojaas P., Amigo J., Cosmelli D., Orio P., Bahamonde M.I., Mann G.E., Vergara C., Latorre R. (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285:1929-1931
119. Vaur S., Bresson-Bepoldin L., Dufy B., Tuffet S., Dufy-Barbe L. (1998) Potassium channel inhibition reduces cell proliferation in the GH3 pituitary cell line. *J Cell Physiol* 177:402-410
120. Von Deimling A., Eibl R.H., Ohgaki H., Louis D.N., von Ammon K., Petersen I., Kleihues P., Chung R.Y., Wiestler O.D., Seizinger B.R. (1992) P53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res* 52:2987-2990
121. Watanabe K., Tachibana O., Sato K., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. (1996) Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathology* 6:217-224
122. Wei A., Solaro C., Lingle C., Salkoff L. (1994) Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron* 13:671-681.
123. Weiger T.M., Holmqvist M.H., Levitan I.B., Clark F.T., Sprague S., Huang W.J., Ge P., Wang C., Lawson D., Jurman M.E., Glucksmann M.A., Silos-Santiago I., DiStefano P.S., Curtis R. (2000) A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neuroscience* 20:2563-3570
124. Werbowetski T., Shivers R.R. (2001) Morphology and migratory behavior of bovine pulmonary artery endothelial cells and C6 astrocytoma cells in a three-dimensional type I collagen matrix. *J Submicrosc Cytol Pathol* 33:349-355
125. Westphal M., Hamel W., Zirkel D., Herrmann H.D., Bilzer T., Reifenberger G., Schober R., Wechsler W., Albert F.K., Behnke J. (1994) Epidermal growth factor receptor expression in human malignant glioma: in vitro and in vivo

effects of application of monoclonal antibodies to the epidermal growth factor receptor. *Recent Results Cancer Res* 135:171-184

126. Weydt P., Möller T., Labrakakis C., Patt S., Kettenmann H. (1997) Neuroligand-triggered calcium signalling in cultured human glioma cells. *Neurosc Letters* 228:91-94
127. Whittle I.R., Macarthur D.C., Malcolm G.P., Li M., Washington K., Ironside J.W. (1998) Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumours. *J Neurooncol* 36:231-42
128. Wick W., Platten M., Weller M. (2001) Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol* 53:177-185
129. Wiecha J., Munz B., Wu Y., Noll T., Tillmanns H., Waldecker B. (1998) Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor. *J Vasc Res* 35:363-371
130. Yamamura H., Ohi Y., Muraki K., Watanabe M., Imaizumi Y. (2001) BK channel activation by Ca²⁺ release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J of Pharmacology* 132:828-834
131. Zhang H., Kelly G., Zerillo C., Jaworski D.M., Hockfield S. (1998) Expression of a cleaved brain specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion in vivo. *J Neurosci* 18:2370-2376

8. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tab. 1 Dignitätsbeurteilung von primären Hirntumoren modifiziert nach Kleihues und Cavenee (2000)

Abb. 2: Tab. 2 Klassifikation von Gliomen in Auszügen aus dem WHO-Schema primärer Hirntumoren (modifiziert nach Kleihues und Cavenee, 2000)

Abb. 3: Struktur der alpha- und beta-Untereinheit des BK-Kanals (modifiziert nach Kaczorowski et al., 1996; Liu et al., 2002)

Abb. 4: Struktur des BK-Kanals bestehend aus 4 alpha-Untereinheiten und einer beta-Untereinheit (modifiziert nach Brenner (2000a) und Homepage)

Abb. 5: Elektrophysiologische Eigenschaften von BK-Kanälen in 1321N1 humanen Gliomzellen (Basrai et al., 2002; Kraft et al., 2001)

Abb. 6: Pharmakologische Beeinflussung der BK-Ströme in 1321N1 humanen Gliomzellen (Abbildung modifiziert nach Basrai et al., 2002).

Abb. 7: Prinzip der Messung der zurückgelegten Strecke während eines 12 h Intervalls schematisch dargestellt an einer Einzelzelle.

Abb. 8: Morphologische Veränderungen einer migrierenden 1321N1 humanen Gliomzelle.

Abb. 9: Darstellung der Migration einer 1321N1 Astrozytomzelle

Abb. 10: Migrationsstrecke bei verschiedenen Konzentrationen des BK-Kanal Blockers TEA (0,5; 1; 5 und 20mmol/l TEA) im Vergleich zur Kontrolle.

Abb. 11: Einfluss von BK-Kanal-Inhibitoren Iberitoxin (IBTX, 100nM) und Paxilline (5µM) auf die Migrationsstrecke bei 1321N1 Zellen.

Abb. 12: Signifikante Inhibierung der Migration unter Zugabe der BK-Kanalaktivatoren Phloretin (100µM), NS1619 (100µM) und Azetylcholin (100µM).

Abb. 13: Phloretinexposition von 1321N1 Zellen während eines bestimmten markierten Zeitintervalls - Nachweis der Reversibilität der Hemmung der Migration unter Einfluss des BK-Kanal Öffners Phloretin (100µM).

Abb. 14: Koapplikation von BK-Kanal aktivierenden und hemmenden Substanzen.

Abb. 15: Einfluss von erhöhtem extrazellulärem Kalium auf die Migration von 1321N1 Astrozytomzellen.

Abb. 16: Einfluss von BK-Kanal-Aktivatoren auf Auswärtsströme in 1321N1-Zellen

Abb. 17: Zusammenfassendes Modell zur Funktion von Ionenkanälen in migrierenden Zellen (modifiziert nach Schwab 2001 a;b).

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Stephan Patt, Dr. Robert Kraft, Lutz Liebmann, Prof. Dr. Jürgen Bolz und Dr. Daniel Basrai,

die Hilfe eines Promotionsberater nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Anhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 08.03.2004

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich es nicht versäumen, mich bei den vielen Menschen zu bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. S. Patt, dessen unendliche Geduld und Schaffenskraft ich immer wieder bewundert habe. Ohne sein Zutun wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Stets hat er mich aufs Neue zu eigenständigem wissenschaftlichen Denken und Arbeiten motiviert.

Große Hilfe habe ich in der Anfangszeit vor allem bei der Einarbeitung in grundlegende Labor-Arbeitsmethoden und die Arbeit mit Zellkulturen von Frau Raabe und Herrn L. Liebmann erhalten. Ich möchte beiden auf diesem Wege ganz herzlich danken.

Für die vielen Anregungen zu meiner Arbeit und die immer schnelle Hilfe bei Problemen möchte ich auch Herrn Dr. R. Kraft ganz besonders herzlich danken. Sein komplexes Wissen und Denken auf dem Gebiet der Elektrophysiologie hat mir des Öfteren geholfen, Sachverhalte besser zu verstehen und in das Gesamtkonzept zu integrieren. Seine Vorarbeiten zusammen mit Herrn Dr. D. Basrai haben erst die Fundamente für die vorliegende Arbeit gesetzt. Allen beiden gebührt mein herzlicher Dank.

Auch Frau Brandstedt aus dem Institut für Medizinische Statistik der Universität Jena gebührt mein Dank für die zuvorkommende und schnelle Bearbeitung von Fragen zur statistischen Aufarbeitung der Daten.

Nicht zuletzt möchte ich allerdings der gesamten Arbeitsgruppe der Neurobiologie der Universität Jena unter Herrn Prof. Dr. Bolz danken, die mich auch als „Außenseiter“ sehr nett in ihr Team integriert hat und mir freizügig Zugang zu ihren Laborräumen und Geräten für die Zeitraffer-Experimente gewährte, als auch immer mit „Rat und Tat“ zur Seite stand – herzlichen Dank !